

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
факультет медико-фармацевтичних технологій
кафедра фармацевтичної хімії

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему: **«СУЧАСНІ МЕТОДИ АНАЛІЗУ І ПОРІВНЯЛЬНА
ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИКОАГУЛЯНТІВ: ВАРФАРИН,
АПІКСАБАНУ ТА РИВАРОКСАБАНУ»**

Виконала: здобувачка вищої освіти групи

226Ф 20Фм(4,6з)дво-01а

спеціальності: 226 Фармація, промислова фармація
освітньої програми Фармація

Ольга ГОРОДНИЧА

Керівник: доцент закладу вищої освіти кафедри
фармацевтичної хімії, к.фарм.н., доцент

Ольга ВІСЛОУС

Рецензент: доцент закладу вищої освіти кафедри
фармакогнозії та нутриціології, к.фарм.н., доцент

Олена НОВОСЕЛ

АНОТАЦІЯ

У роботі досліджено сучасні методи аналізу варфарину, апіксабану та ривароксабану. Розглянуто спектрофотометрію, ВЕРХ, екологічні підходи із застосуванням біосумісних розчинників. Показано оптимізацію умов аналізу та впровадження принципів зеленої хімії. Робота містить 3 розділів, 47 сторінок, 14 рисунків, 7 таблиць, 113 джерел літератури.

Ключові слова: антикоагулянти, варфарин, апіксабан, ривароксабан, спектрофотометрія, HPLC, зелена хімія.

ANNOTATION

This study examines modern methods for analyzing warfarin, apixaban, and rivaroxaban. Spectrophotometry, HPLC, eco-friendly approaches with biocompatible solvents are highlighted. Optimization of analytical conditions and green chemistry principles are emphasized. The work includes 3 sections, 47 pages, 14 figures, 7 tables, and 113 references.

Keywords: anticoagulants, warfarin, apixaban, rivaroxaban, spectrophotometry, HPLC, green chemistry.

ЗМІСТ

ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. ФАРМАКОЛОГІЧНІ ОСНОВИ ФУНКЦІОНУВАННЯ АНТИКОАГУЛЯНТІВ	6
1.1 Біохімічні механізми дії варфарину, апіксабану та ривароксабану: порівняльний аналіз	6
1.2 Фармакокінетика та фармакодинаміка: молекулярний вплив на системи згортання крові варфарину, апіксабану та ривароксабану	10
1.3 Лікарські форми та клінічні аспекти застосування антикоагулянтів	16
Висновки до розділу 1	18
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	19
2.1 Об'єкти дослідження	19
2.2 Методи дослідження	24
Висновки до розділу 2	26
РОЗДІЛ 3. ЕКОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ТА МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ АНТИКОАГУЛЯНТІВ	27
3.1 Методи хроматографічного аналізу антикоагулянтів	27
3.2 Спектрофотометричний аналіз: особливості застосування для варфарину, апіксабану та ривароксабану	37
3.3 Впровадження зелених підходів у фармацевтичний аналіз антикоагулянтів	40
Висновки до розділу 3	44
ВИСНОВКИ	46
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ	48

ВСТУП

Актуальність теми. Тромбоемболічні захворювання залишаються однією з основних причин смертності та інвалідності як у світі, так і в Україні. За даними дослідження [Error! Reference source not found.], більше 10 мільйонів випадків венозної тромбоемболії (VTE) щорічно реєструється у світі, з них понад 100 тисяч у країнах Європи. В Україні, згідно з офіційною статистикою МОЗ [2], поширеність фібриляції передсердь, основного фактора ризику тромбоемболії, становить 1,2% серед дорослого населення. Водночас пандемія COVID-19 привернула увагу до тромбозів як одного з найпоширеніших ускладнень цієї інфекції, що додатково підкреслює необхідність удосконалення аналізу та характеристик антикоагулянтів [3].

Антикоагулянти, зокрема варфарин, апіксабан та ривароксабан, є основою профілактики та лікування цих захворювань. У той час як варфарин залишається широко використовуваним через його доступність, нові оральні антикоагулянти (НОАК), такі як апіксабан і ривароксабан, демонструють переваги у вигляді меншої кількості взаємодій і відсутності необхідності частого моніторингу [3]. Однак питання порівняльної ефективності, безпеки, а також доступності цих препаратів для українських пацієнтів потребує подальшого вивчення.

Мета дослідження. Дослідження хімічних властивостей, методів синтезу, стабільності та аналітичного контролю антикоагулянтів – варфарину, апіксабану та ривароксабану – з метою вдосконалення їх хімічної стандартизації, оцінки впливу структурних особливостей на активність та розробки рекомендацій щодо підвищення їх стабільності.

Завдання дослідження:

- Визначити механізми дії, фармакокінетичні та фармакодинамічні особливості досліджуваних препаратів.
- Дослідити хімічні властивості, зокрема структуру, стабільність і фізико-хімічні характеристики антикоагулянтів.

- Оцінити сучасні аналітичні методи (спектроскопічні, хроматографічні, мас-спектрометричні) для контролю якості.
- Провести порівняльний аналіз ефективності та безпеки варфарину, апіксабану та ривароксабану в контексті українських клінічних даних.

Об'єкт дослідження.

Антикоагулянтні препарати: варфарин, апіксабан, ривароксабан.

Предмет дослідження: фармакологічні, хімічні та аналітичні характеристики антикоагулянтів, їх ефективність та безпека.

Методи дослідження: робота базується на систематизації та аналізі сучасної літератури, включаючи клінічні дослідження, результати аналітичних тестів та дані статистики. Використовуються порівняльний, системний та аналітичний методи.

Практичне значення отриманих результатів. Результати дослідження можуть бути використані для вдосконалення фармацевтичного контролю якості антикоагулянтів в Україні, покращення їх стабільності та ефективності в лікуванні тромбоемболічних ускладнень, зокрема у пацієнтів із COVID-19.

Структура та обсяг: кваліфікаційна робота складається з переліку умовних скорочень, вступу, чотирьох розділів, загальних висновків, переліку використаних літературних джерел. Робота викладена на 47 сторінок. Містить 14 рисунків, 7 таблиць, 113 джерел літератури.

РОЗДІЛ 1

ФАРМАКОЛОГІЧНІ ОСНОВИ ФУНКЦІОНУВАННЯ АНТИКОАГУЛЯНТІВ

Антикоагулянти є невід'ємною частиною сучасної медицини, особливо в профілактиці та лікуванні тромбоемболічних ускладнень. Вони застосовуються для запобігання венозним та артеріальним тромбозам, які можуть призводити до таких тяжких станів, як інсульт, інфаркт міокарда чи тромбоемболія легеневої артерії [4, 5].

Сучасна класифікація антикоагулянтів базується на їх механізмі дії:

- Непрямі антикоагулянти, такі як варфарин, які впливають на синтез факторів згортання крові через інгібування ферменту вітамін К-епоксидредуктази [6].
- Прямі антикоагулянти, які діють безпосередньо на фактори згортання крові, зокрема тромбін або фактор Ха, забезпечуючи швидкий і передбачуваний ефект [7, 8].

Ефективність цих препаратів значно покращила прогноз для пацієнтів із тромбозами, забезпечуючи зниження ризику ускладнень та летальних випадків. Однак їх використання супроводжується ризиком ускладнень, таких як кровотечі, що вимагає комплексного підходу до вибору терапії [9].

Для забезпечення максимальної безпеки та ефективності терапії важливо розуміти фармакологічні основи функціонування антикоагулянтів, їх фармакокінетику, фармакодинаміку та вплив на організм залежно від індивідуальних особливостей пацієнтів [10].

1.1. Біохімічні механізми дії варфарину, апіксабану та ривароксабану: порівняльний аналіз.

Варфарин є класичним пероральним антикоагулянтом, що належить до групи кумаринів. Його основний механізм дії пов'язаний із пригніченням

синтезу факторів коагуляції, залежних від вітаміну К, зокрема II, VII, IX і X [11]. Варфарин блокує активність ферменту епоксидредуктази, що необхідний для відновлення вітаміну К до його активної форми. Це призводить до зниження активності факторів коагуляції, що гальмує утворення тромбів. Однак варфарин має низку недоліків, таких як висока індивідуальна варіабельність ефекту, потреба в регулярному моніторингу МНС (міжнародне нормалізоване співвідношення) і численні лікарські та харчові взаємодії [12, 13].

Апіксабан є інгібітором фактора Ха, який безпосередньо блокує активність цього ключового компонента каскаду коагуляції, попереджаючи утворення тромбинного комплексу. Його механізм дії не залежить від вітаміну К, що дозволяє уникнути багатьох взаємодій з іншими ліками та продуктами харчування, властивих варфарину [14]. Апіксабан продемонстрував високу ефективність у зменшенні ризику інсультів та тромбоемболічних ускладнень при фібриляції передсердь, а також є безпечним у пацієнтів з високим ризиком кровотеч [15]. Відсутність необхідності у моніторингу параметрів коагуляції робить апіксабан зручним у використанні [16].

Ривароксабан, подібно до апіксабану, є пероральним прямим інгібітором фактора Ха. Його механізм дії також полягає в блокуванні активності фактора Ха, що запобігає перетворенню протромбіну на тромбін [17]. Ривароксабан застосовується для профілактики та лікування тромбоемболічних подій при різних захворюваннях, таких як «*deep vein thrombosis*» (DVT) та легенева емболія, а також у пацієнтів з фібриляцією передсердь [18, 19]. Ривароксабан відзначається високою біодоступністю та зручністю в застосуванні, оскільки не потребує регулярного моніторингу [20, 21, 22].

Порівняння механізмів дії (табл. 1.1):

1. **Ривароксабан і апіксабан** мають подібний механізм дії, оскільки обидва інгібують фактор Ха, який є важливим для активізації тромбіну. Тромбін, в свою чергу, сприяє утворенню фібрину і формуванню тромбу [6, 7].

- Ривароксабан діє незворотно, що означає, що після припинення прийому препарату його ефект не може бути швидко відмінений, що може бути важливим для моніторингу терапії [8, 9].

- Апіксабан також інгібує фактор Ха, але має інші характеристики в механізмі дії, зокрема відсутність залежності від антитромбіну III [7, 10].

2. **Варфарин**, на відміну від ривароксабану та апіксабану, блокує активність вітаміну К, що призводить до порушення синтезу важливих коагуляційних факторів. Це порушує каскад зсідання крові і запобігає утворенню тромбів [11, 12]. Однак варфарин має багато взаємодій з іншими лікарськими засобами і харчовими продуктами, що може ускладнювати його використання [13, 14].

Застосування в клінічній практиці:

- **Ривароксабан** та **апіксабан** часто застосовуються для короткострокової терапії після операцій на суглобах і для профілактики інсультів при фібриляції передсердь, оскільки вони не вимагають регулярного моніторингу, на відміну від варфарину [8, 15, 16].

- **Варфарин** через свою складну взаємодію з їжею та іншими лікарськими засобами потребує частого контролю рівня Міжнародного нормалізованого відношення, що може бути недоцільним для пацієнтів, яким потрібна проста і стабільна терапія [14, 19, 22].

Таблиця 1.1

Біохімічні механізми дії та показання

Препарат	Механізм дії	Показання	Протипоказання та обмеження
Ривароксабан	Інгібує фактор Ха, який необхідний для активації протромбіну (фактор II) до тромбіну (фактор IIa). Тромбін перетворює	- Профілактика тромбоемболічних ускладнень після операцій на колінному та тазостегновому суглобах. - Профілактика	- Не рекомендується при важких порушеннях функції нирок (кліренс креатиніну <30 мл/хв).

	фібриноген у фібрин, що утворює сітку для тромбу. Інгибує як вільний, так і зв'язаний з тромбом фактор Ха. Дія незворотня.	інсультів та системних емболій при фібриляції передсердь. - Лікування і профілактика глибокої венозної тромбозу (ГВТ) і легеневої емболії (ЛЕ). - Зниження ризику повторного ГВТ та/або ЛЕ.	
Апіксабан	Вибірково інгібує фактор Ха у вільній і зв'язаний з тромбом формі. Препарат не залежить від антитромбіну III, також інгібує протромбін. Перешкоджає утворенню тромбу.	- Профілактика інсультів та системних емболій при фібриляції передсердь. - Профілактика ГВТ, що призводить до ЛЕ, після операцій на колінному та тазостегновому суглобах. - Лікування ГВТ і ЛЕ, зниження ризику рецидивів.	- Можуть бути протипоказання для пацієнтів з серйозними проблемами з нирками або печінкою, треба обережно призначати для осіб з високим ризиком кровотеч.
Варфарин	Антагоніст вітаміну К, інгібує синтез коагуляційних факторів VII, IX, X і тромбіну через блокування ферменту вітамін К	- Профілактика та лікування венозних тромбоемболій. - Профілактика інсультів при фібриляції передсердь.	- Протипоказаний при вагітності (може спричинити мертвонароджуваність, передчасні пологи, внутрішньоутробні кровотечі).

	епоксидредуктази. Цей процес перешкоджає γ -карбоксилуванню цих факторів, необхідному для їх активності.	- Профілактика та лікування тромбоутворення в умовах штучних клапанів серця або після хірургічних операцій на серці.	- Має численні взаємодії з іншими лікарськими засобами.
--	--	--	---

1.2. Фармакокінетика та фармакодинаміка: молекулярний вплив на системи згортання крові варфарину, апіксабану та ривароксабану

У хімічних структурах варфарину, апіксабану та ривароксабану: містяться кілька важливих функціональних груп, таких як ароматичні кільця, карбонільні групи, амідні групи, придинові та бензотіазольні цикли, що визначають їх фізико-хімічні властивості, а також механізм дії, метаболізм та взаємодії з іншими речовинами в організмі. Ці функціональні групи є ключовими для їх фармакокінетики і фармакодинаміки, а також для визначення потенційних побічних ефектів та взаємодій [23, 24].

Хімічна структура та функціональні групи варфарину.

Варфарин є синтетичним похідним кумарину, що містить ароматичне кільце, яке забезпечує його здатність до високого зв'язування з білками плазми, особливо з альбуміном. Це забезпечує триваліший період напіввиведення препарату, що дозволяє підтримувати стабільну концентрацію в плазмі крові. Основні функціональні групи, що визначають його властивості [23, 25]:

Кумаринове кільце: ця структура має карбонільну групу ($-C=O$), яка є критично важливою для інгібування ферменту вітамін К-епоксид редуктази, необхідного для синтезу факторів згортання крові.

Гідроксильна група ($-OH$) розташована на ароматичному кільці, вона відіграє ключову роль у метаболізмі препарату через фазу кон'югації, що полегшує його виведення.

Ефірна група (-O-): підтримує стабільність молекули і впливає на зв'язування з білками плазми [26].

Взаємодія варфарину з вітаміном К-епоксид редуктазою була змодельована за допомогою молекулярного докінгу (PDB ID: 2PWZ) [27].

Карбонільна група кумаринового кільця утворює водневі зв'язки з активними залишками ферменту, а гідроксильна група сприяє стабільності комплексу.

Метаболічний процес:

Основним органом метаболізму варфарину є печінка. Варфарин підлягає значному метаболізму за допомогою ферментів цитохрому Р450, зокрема СУР2С9, але також беруть участь ферменти СУР1А2 та СУР3А4 [23, 28].

Ці ферменти здійснюють окислення ароматичних кілець молекули варфарину, утворюючи кілька метаболітів. Переважно утворюються два основні метаболіти, які зберігають часткову активність [28]:

4'-гідроксivarфарин – головний метаболіт, що утворюється внаслідок окислення за участю СУР2С9. Він має значно знижену антикоагулянтну активність порівняно з варфарином, однак він все ж зберігає певну здатність впливати на каскад згортання.

2'-гідроксivarфарин – менш активний метаболіт, що утворюється за допомогою менш значущого шляху метаболізму.

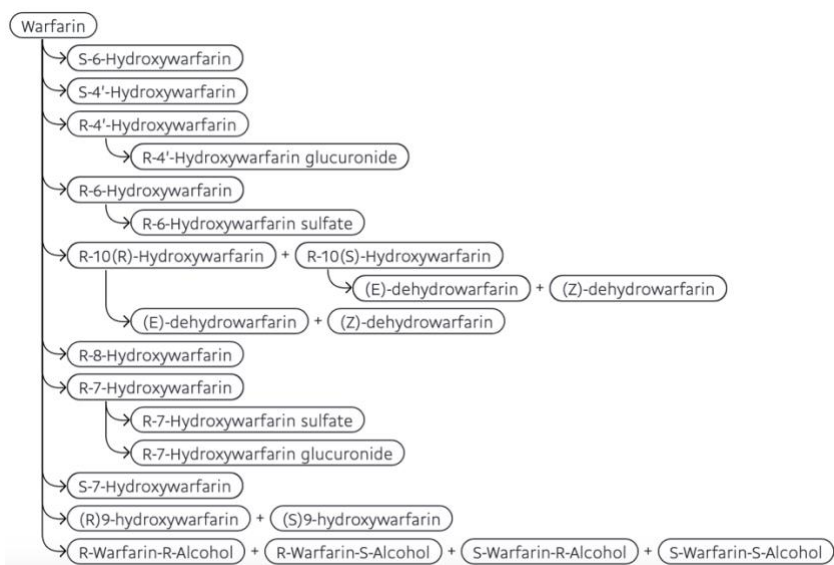


Рис. 1.1. Метаболізм варфарину

Загалом, активність метаболітів варфарину є значно нижчою з активність самого препарату. Крім того, варфарин має низьку біодоступність, оскільки значна частина препарату піддається першому метаболізму в печінці перед тим, як потрапити в загальний кровотік [29].

Хімічна структура та функціональні групи апіксабану.

Апіксабан є оригінальним інгібітором фактора Ха, що має молекулярну структуру, яка дозволяє селективно взаємодіяти з активною формою цього ферменту. На відміну від варфарину, апіксабан не потребує постійного моніторингу, оскільки він має більш передбачувану фармакокінетику. Основні функціональні групи [30]:

Піридинова група: входить до складу піридиназольного циклу, що забезпечує специфічність препарату до фактора Ха завдяки його взаємодії з активними залишками ферменту.

Оксазоліновий цикл: формує додаткові зв'язки з гідрофобними кишенями ферменту, підвищуючи селективність апіксабану.

Карбоамідна група (-C(=O)N-): бере участь у взаємодії з донорами водневих зв'язків, сприяючи міцності комплексу.

Гідроксильна група (-ОН): важлива для процесів розчинення та метаболізму препарату.

Апіксабан демонструє сильне зв'язування з фактором Ха: (PDB ID: 2W26). Оксазоліновий цикл стабілізує молекулу через гідрофобні взаємодії, тоді як карбоамідна група формує ключові водневі зв'язки з активним центром ферменту.

Метаболічний процес:

Апіксабан метаболізується в печінці переважно за участю ферментів **CYP3A4** і **CYP3A5**, а також частково шляхом гідролізу та деметилування [31]. Однак апіксабан має ще один важливий механізм виведення – часткове виведення через нирки в незміненому вигляді, що робить його ефективним для лікування пацієнтів з нормальними функціями нирок [32]. Важливим аспектом

є те, що апіксабан не взаємодіє з антитромбіном III, на відміну від інших препаратів цього класу [33].

Метаболіти:

- **Гідроксильований апіксабан** – головний метаболіт апіксабану, що утворюється через окислення молекули препарату. Цей метаболіт має значно знижену активність, ніж апіксабан, але все ще здатен блокувати фактор Ха.
- **Деметильований апіксабан** – має ще меншу антикоагулянтну активність, ніж гідроксильований метаболіт.

Ці метаболіти мають меншу активність, що дозволяє препарату мати передбачувану дію без необхідності корекції доз [34].



Рис. 1.2. Метаболізм апіксабану

Хімічна структура та функціональні групи ривароксабану Ривароксабан є специфічним інгібітором фактора Ха, з молекулою, яка містить бензотіазольну групу, що забезпечує високу селективність та ефективність блокування цього ферменту. Його хімічна структура є важливою для того, щоб препарат специфічно взаємодівав із фактором Ха, а не з іншими компонентами системи згортання [35]:

Бензотіазольна група: включає атоми сірки та азоту, які забезпечують специфічність взаємодії з кишенею S1 ферменту.

Гідроксильна група (-OH): підвищує розчинність препарату та полегшує його метаболізм.

Амідна група (-C=O-NH-): сприяє стабілізації молекули та її взаємодії з активними залишками ферменту.

Карбоамідна група (-C=O-NH-): забезпечує додаткову міцність ліганд-ферментного комплексу.

Метаболічний процес:

Ривароксабан також метаболізується в печінці, але його метаболізм відрізняється від апіксабану та варфарину. Основними ферментами, що відповідають за метаболізм ривароксабану, є **CYP3A4** і **CYP2J2**, а також частково **CYP2C9** [36]. Після всмоктування в шлунково-кишковому тракті, ривароксабан піддається першому метаболізму в печінці.

Метаболіти:

- **3'-гідроксиривароксабан** – це основний метаболіт, утворюється через окислення молекули за допомогою **CYP3A4**. Він має значно знижену антикоагулянтну активність у порівнянні з ривароксабаном [37].
- Інші метаболіти, такі як деметильовані та глюкуронідні форми, не мають значної антикоагулянтної активності [38].

Ривароксабан також виводиться в основному з сечею у вигляді незміненого препарату або його метаболітів, що зменшує потенціал для взаємодії з іншими лікарськими засобами [39].

Розуміння хімічної структури та функціональних груп цих антикоагулянтів дозволяє краще зрозуміти їх молекулярну взаємодію з ферментами-мішенями та механізм дії. Однак важливим аспектом їхнього клінічного застосування є фармакокінетика, яка описує всмоктування, розподіл, метаболізм і виведення з організму. У кожного з цих антикоагулянтів є свої особливості фармакокінетики, які впливають на їх застосування у клінічній практиці [40] (табл. 1.2).

Таблиця 1.2

Порівняльний аналіз фармакокінетичних характеристик

Препарат	Всмоктування	Розподіл	Метаболізм	Виведення
Варфарин	Швидко всмоктується в шлунково- кишковому тракті	Розподіляється у тканинах і зв'язується з білками плазми (99%)	Метаболізується в печінці через цитохром P450, зокрема CYP2C9	Виводиться через нирки у вигляді метаболітів. Половина

	(біодоступність 100%)			часу: 20-60 годин
Апіксабан	Швидко всмоктується, біодоступність $\approx 50\%$	Розподіляється у плазмі крові, зв'язується з білками на 87%	Метаболізується в печінці через CYP3A4 і CYP3A5.	Виводиться через нирки і жовч. Половина часу: 12 годин
Рівароксабан	Біодоступність $\approx 80-100\%$ (залежно від дози)	Має високий ступінь зв'язування з білками плазми (92-95%)	Метаболізується в печінці через CYP3A4 та CYP2J2	Виводиться через нирки (36%) і через жовч (33%). Половина часу: 5-13 годин

Фармакодинаміка описує вплив препарату на організм і механізм його дії. У випадку з антикоагулянтами механізм дії пов'язаний з інгібуванням компонентів згортання крові, що порушує нормальний каскад згортання (табл. 1.3).

Таблиця 1.3

Порівняльний аналіз фармакодинамічних характеристик

Препарат	Цільовий компонент системи згортання	Молекулярні ефекти
Варфарин	Фактори VII, IX, X, II, білки C і S.	Викликає порушення функції вітаміну К, що призводить до зниження активності багатьох коагуляційних факторів.
Апіксабан	Фактор Ха	Знижує рівень активного тромбіну та перешкоджає утворенню

		тромбу, не впливаючи на антитромбін III.
Ривароксабан	Фактор Ха	Вибірково блокує фактор Ха, що призводить до зниження генерації тромбіну і припиняє каскад згортання крові.

Порівняльний аналіз фармакокінетичних та фармакодинамічних характеристик:

1. Всмоктування та біодоступність:

Варфарин має 100% біодоступність, що дозволяє йому швидко потрапляти в кров, однак його ефект може відрізнятися у залежності від індивідуальних відмінностей метаболізму [40].

Апіксабан має середню біодоступність (~50%), тому ефект може бути трохи менш стабільним, але цей препарат не потребує спеціального контролю INR, що робить його більш зручним для клінічного використання [32].

Ривароксабан має високу біодоступність (~80-100%), що забезпечує стабільніший ефект без необхідності моніторингу рівня Міжнародного нормалізованого відношення [37].

2. Виведення:

Варфарин виводиться через нирки у вигляді метаболітів, що може бути важливим фактором при наявності проблем з нирками [38].

Апіксабан виводиться як через нирки, так і через жовч, що робить його менш залежним від функції нирок, проте варто враховувати можливі побічні ефекти при порушенні функції печінки [33].

Ривароксабан також має двояке виведення (нирки та жовч), що дає йому певну гнучкість при виборі стратегії лікування [40].

1.3. Лікарські форми та клінічні аспекти застосування антикоагулянтів

Антикоагулянти, такі як варфарин, апіксабан та ривароксабан, доступні у різних лікарських формах, що забезпечує зручність їх використання залежно від клінічних потреб пацієнта [41, 42, 43]. Варфарин найчастіше випускається у вигляді таблеток, що дозволяє легко регулювати дозування [44]. Апіксабан і ривароксабан також доступні у формі таблеток, які приймаються перорально, що сприяє їх популярності серед пацієнтів із хронічними захворюваннями [42, 43, 45].

Клінічні аспекти застосування включають аналіз ефективності та безпеки цих препаратів. Варфарин потребує постійного моніторингу міжнародного нормалізованого відношення (МНВ) через його вузький терапевтичний індекс [46]. Апіксабан та ривароксабан, натомість, характеризуються передбачуваним ефектом і меншою потребою в лабораторному контролі, що робить їх привабливими в амбулаторній практиці [42, 43].

Усі три препарати мають потенціал до побічних реакцій, серед яких найважливішими є кровотечі різного ступеня тяжкості [47]. Варфарин відомий тератогенний ефект препарату робить його застосування під час вагітності небезпечним [44]. Передозування може спричинити масивні кровотечі з боку слизових оболонок, травного тракту та сечостатевої системи [44]. Лікування включає введення вітаміну К, свіжозамороженої плазми або протромбінового комплексу для відновлення коагуляційного статусу [44].

При цьому апіксабан і ривароксабан виявляють кращий профіль безпеки порівняно з варфарином завдяки меншій кількості серйозних кровотеч [43, 48].

Хімічна взаємодія з іншими лікарськими засобами та харчовими компонентами є ще одним важливим аспектом, особливо у випадку варфарину, який часто взаємодіє з вітаміном К, що міститься в багатьох харчових продуктах (наприклад, зелені листові овочі), можуть знижувати ефективність препарату, викликаючи необхідність корекції дози. Також варто уникати грейпфрутових продуктів, які можуть збільшити ризик кровотеч через

вплив на метаболізм варфарину. Це робить дотримання дієти критично важливим для пацієнтів, які приймають цей препарат [44, 49].

Апіксабан не рекомендується споживати грейпфрутові продукти та трави з антикоагулянтною активністю (наприклад, часник, імбир, гінкго білоба). Такі взаємодії можуть підвищувати ризик кровотеч [48, 50, 51].

Ривароксабан слід уникати одночасного прийому з препаратами, що містять звіробій, оскільки це знижує рівень ривароксабану в крові. Прийом із їжею підвищує біодоступність препарату в дозах 15-20 мг, тоді як у дозі 10 мг їжа не має суттєвого впливу [52].

Висновок до розділу 1

Порівняльний аналіз варфарину, апіксабану та ривароксабану свідчить про те, що останні два препарати є більш сучасними та зручними у застосуванні, мають мінімальні взаємодії з іншими ліками і не потребують регулярного моніторингу, що робить їх вигідними в клінічній практиці. Варфарин, у свою чергу, залишається важливим інструментом для пацієнтів, у яких є специфічні клінічні показання або при недостатній доступності новітніх препаратів.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Фізико-хімічні властивості активних речовин мають вирішальне значення для визначення їх ефективності, стабільності та безпеки, а також для розробки лікарських форм, здатних забезпечити належну біодоступність і терапевтичний ефект. Вивчення таких характеристик, як структура молекул, термодинамічні параметри, взаємодії з іншими компонентами та механізми деградації активних інгредієнтів, дозволяє прогнозувати поведінку препаратів в умовах використання, а також визначати можливі шляхи покращення їх стабільності та ефективності.

2.1. Об'єкти дослідження

Апіксабан є антикоагулянт, що належить до категорії інгібіторів фактора Ха. Його хімічна назва – 1-(4-Метоксіфенілен)-7-оксо-6-(4-(2-оксо-2-(піперидинил)етокси)фенілен)-4,5-дигідро-1Н-піразоло[3,4-с]піридин-3-карбоксамід (рис. 2.1), і молекулярна формула $C_{25}H_{25}N_5O_4$. Молекулярна маса складає 459,50 г/моль [53, 54].

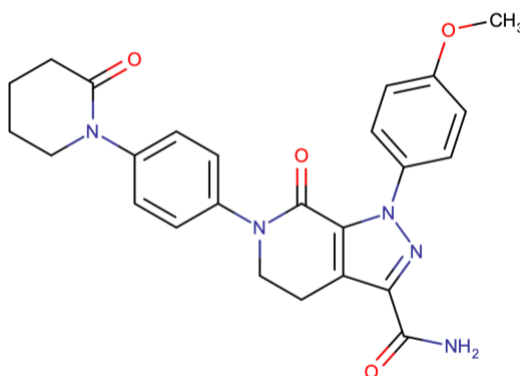


Рис. 2.1. Хімічна структура апіксабан

Апіксабан має складну поліциклічну структуру, яка включає піридиновий цикл, карбоксамідну групу та оксіалкільні замісники, що

забезпечують високу селективність до активного центру фактора Ха, що бере участь у процесах гемостазу [55].

Апіксабан характеризується точкою плавлення в діапазоні 230-233°C, що свідчить про його високу термостабільність [56]. Однак він малорозчинний у воді (0.04 мг/мл), що обмежує його використання в рідких формах [57]. Для полегшення розчинення він розчиняється у диметилсульфоксиді [58].

Хроматографічний аналіз апіксабану проводиться методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з використанням C18-колонки, при цьому як рухома фаза застосовується суміш ацетонітрилу та води з рН 4,5. УФ-виявлення проводиться при довжині хвилі 280 нм, що дозволяє ефективно виявляти апіксабан у препаратах [59].

Апіксабан є чутливим до окислення при контакті зі світлом, що може призвести до його деградації. Це є важливим фактором, який необхідно враховувати під час зберігання препарату. З цієї причини для упаковки апіксабану рекомендується використовувати матеріали, що захищають від світла, зокрема алюмінієву фольгу, яка мінімізує вплив світла на активну речовину і зберігає її стабільність [60].

Ривароксабан ще один потужний інгібітор фактора Ха з хімічною назвою 5-хлор-N-(5-хлор-2-тієніл)-2-фураніл)-2-(4-(морфолін-4-іл)феніл)-2-оксоамідацетамід (рис. 2.2). Молекулярна формула ривароксабану – $C_{19}H_{18}Cl_2N_3O_5S$, молекулярна маса – 435,88 г/моль [61].

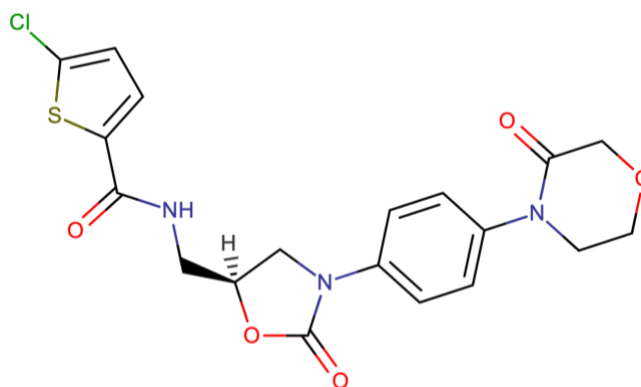


Рис. 2.2. Хімічна структура ривароксабан

В його структурі наявні тієнільна та фуранільна групи, які сприяють зв'язуванню з активними центрами фактору Ха, блокуючи його активність і таким чином знижуючи ймовірність утворення тромбів [62].

Ривароксабан має точку плавлення 230°C, що також вказує на його стабільність при високих температурах [62]. Розчинність ривароксабану у воді складає 0,7 мг/мл при 25°C, що робить його більш розчинним порівняно з апіксабаном, а також він добре розчиняється в органічних полярних розчинниках [63]. Для хроматографічного аналізу використовують ВЕРХ з рухомою фазою, що складається з метанолу та фосфатного буфера з рН 5,0. Це дозволяє досягнути точного розділення та виявлення ривароксабану в зразках. [64].

Ривароксабан схильний до деградації при рН вище 7, що вказує на його нестабільність в лужних середовищах [65]. Це важливе зауваження для фармацевтичних розробок, адже для збереження стабільності препарату необхідно уникати контактів з лужними речовинами або створювати препарати, які підтримують оптимальне рН середовища [65].

Варфарин – класичний антикоагулянт, що є похідним 4-гідроксикумарину. Хімічна назва варфарину – 3-(α -ацетиламіно)-1-(4-гідроксикумарин-3-ілен)-2-пропанон (рис. 2.3), молекулярна формула $C_{19}H_{16}O_4$, а молекулярна маса – 308,33 г/моль [66]. Варфарин має кетогрупу в бічному ланцюзі, що визначає його антагоністичну активність щодо вітаміну К, що є важливим фактором при регуляції процесів згортання крові [67].

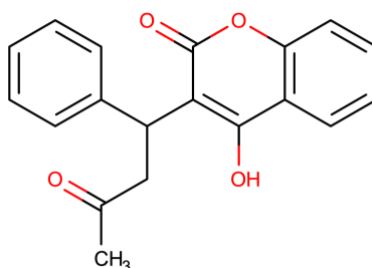


Рис. 2.3. Структура варфарин

Варфарин має точку плавлення в діапазоні 161-162°C, що вказує на його відносно низьку стабільність порівняно з іншими двома

антикоагулянтами [68]. Варфарин добре розчинний у воді (1,1 мг/мл при 25°C) та органічних розчинниках, таких як етанол і пропіленгліколь [69]. Для аналізу варфарину застосовують ВЕРХ з рухомою фазою, що складається з метанолу та води в пропорції 70:30. Така композиція дозволяє здійснювати ефективне розділення та виявлення варфарину в складних матрицях [70].

Варфарин може зазнавати окислення гідроксикумаринової групи при контакті з вологим повітрям, що знижує його ефективність і призводить до утворення небажаних побічних продуктів [71]. Тому для зберігання варфарину також важливо враховувати умови, які мінімізують вологість і забезпечують стабільність його молекул [70, 72].

Для кожної з розглянутих сполук характерна певна кристалічна структура, що значною мірою визначає їх фізичні властивості. Наприклад, апіксабан утворює моноклінні кристали з параметрами ґратки $a=8.912\text{Å}$, $b=13.452\text{Å}$, $c=15.876\text{Å}$, $\beta = 102.5^\circ$, що дозволяє забезпечити його стабільність у твердій фазі [73]. Це важливо для формулювання лікарських форм, оскільки його кристалічна форма безпосередньо впливає на біодоступність та ефективність препарату в організмі [74].

Ривароксабан, у свою чергу, демонструє орторомбічну кристалічну структуру, що забезпечує його стабільність при зберіганні [75]. Дифрактограма ривароксабану надає чіткий пік при $2\theta = 24^\circ$, що є важливим параметром для визначення оптимальних умов зберігання та використання [76].

Варфарин має значно більш складну поведінку в твердій фазі, зокрема, проявляє поліморфізм. Це означає, що варфарин може переходити між аморфними та кристалічними формами в залежності від умов зберігання та обробки. Поліморфізм може призводити до змін біодоступності варфарину, що потрібно враховувати при розробці лікарських форм та процесів виробництва [77, 78, 79].

Термічні та енергетичні властивості. Термодинамічні властивості активних речовин також важливі для прогнозування їх стабільності при різних

умовах зберігання та застосування. Апіксабан, зокрема, має енергію активації термічної деградації близько 125 кДж/моль, що вказує на його здатність стабільно існувати до температури 250°C. Однак при нагріванні вища температура призводить до деградації молекули через розпад піридинового циклу, що є важливим при виготовленні і зберіганні лікарських форм [73].

Ривароксабан демонструє термодинамічну стабільність у діапазоні рН=3-7, що робить його стійким в умовах кислотних та нейтральних середовищ, характерних для шлунково-кишкового тракту. Однак при контакті з киснем та ультрафіолетовим випромінюванням ривароксабан може деградувати до карбоксильних кислот через розпад морфолінового кільця [75, 76].

Варфарин виявляє підвищену схильність до окислення, що сприяє утворенню хінонових похідних. Це є важливим фактором для його стабільності та токсикологічного профілю, оскільки такі сполуки можуть мати мутагенну активність [71, 77].

Взаємодія з іншими компонентами. Фармацевтичні властивості активних речовин також значно залежать від їх взаємодії з іншими компонентами лікарської форми. Наприклад, апіксабан взаємодіє з целюлозними носіями в таблетках, що сприяє підвищенню його розчинності в шлунково-кишковому тракті. Ці взаємодії можуть значно покращити біодоступність активної речовини, що є важливим для забезпечення її терапевтичного ефекту [74].

Ривароксабан, в свою чергу, демонструє взаємодію з лактозою, що підвищує його стабільність. Однак при наявності деяких інертних компонентів, таких як магній оксид, можуть відбуватися деградаційні процеси, що знижує ефективність препарату [75].

Варфарин є класичним прикладом препарату, що схильний до численних лікарських взаємодій. Окремі компоненти, такі як поліетиленгліколь, можуть спричиняти утворення окислених продуктів, що

впливають на біодоступність та ефективність лікарської форми [72, 78, 79]. Це потребує обережності при розробці комбінованих лікарських засобів [79].

Механізми деградації та токсичні продукти. Деградація активних речовин є важливою частиною вивчення їх стабільності, оскільки розпад молекул може призвести до утворення небезпечних або токсичних побічних продуктів. Апіксабан виявляє схильність до гідролізу амідних зв'язків, що приводить до утворення поліциклічних амінів. Ці продукти можуть бути токсичними для організму, особливо при тривалому зберіганні або неправильному зберіганні препарату [73].

Ривароксабан розпадається за участі світла та кисню, утворюючи карбоксильні кислоти, що можуть мати алергенні властивості. У разі неправильного зберігання в умовах підвищеної температури або вологого середовища деградація ривароксабану може призвести до утворення токсичних продуктів [75].

Варфарин має схильність до окислення, що приводить до утворення хінонових похідних. Ці сполуки можуть мати мутагенну активність і спричиняти токсичні ефекти, особливо при довготривалому вживанні або високих дозах препарату [71, 77].

2.2. Методи дослідження

Для забезпечення високої точності досліджень використовуються сучасні методики аналізу, зокрема спектральні, хроматографічні, мас-спектрометричні методи, а також методи визначення стабільності. Вони забезпечують аналіз якості, стабільності та ідентифікації активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ).

Спектральні методи

1. Ультрафіолетова (УФ) спектроскопія

Апіксабан демонструє чітке поглинання в ультрафіолетовій області, що дозволяє з високою точністю визначати концентрацію речовини в розчині. У

дослідженнях виявлено, що максимальний пік поглинання для апіксабану становить 280 нм, що є важливим параметром для кількісного аналізу та ідентифікації домішок у фармацевтичних формах [80].

2. Інфрачервона (ІЧ) спектроскопія

Ривароксабан, через наявність специфічних функціональних груп, таких як карбонільна група, показує характерні піки в ІЧ-спектрі. Виявлення цих піків допомагає не лише в ідентифікації активної речовини, але й у дослідженні її стабільності під час зберігання [81].

3. Раман-спектроскопія

Варфарин, як похідне 4-гідроксикумарину, має виражені раманівські піки, що можуть бути використані для аналізу змін у структурі молекули під час деградації. Порівняння спектрів варфарину до та після зберігання дозволяє оцінити термін придатності препарату та виявити потенційно токсичні продукти деградації [82].

4. Ядерний магнітний резонанс (ЯМР)

ЯМР-спектроскопія дозволяє вивчити детальну структуру молекул АФІ, включаючи всі хімічні зв'язки. З його допомогою можна визначити зміни в структурі активних інгредієнтів, що відбуваються при їх деградації [83].

Хроматографічні методи.

Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) використовується для аналізу чистоти і домішок у препаратах. Для апіксабану та ривароксабану використовували колонки типу C18 і рухомі фази на основі ацетонітрилу та води (рН 4.5). Для варфарину використовували метанольно-водний розчин у співвідношенні 70:30. УФ-виявлення проводилося при довжинах хвиль 280 нм для апіксабану, 245 нм для ривароксабану та 254 нм для варфарину [84].

Мас-спектрометрія.

Мас-спектрометрія дозволяє отримати точні дані про молекулярну масу АФІ та виявляти побічні продукти метаболізму. Для апіксабану та ривароксабану цей метод є важливим для аналізу їх молекулярної структури та взаємодії з іншими компонентами фармацевтичних форм [85].

Рентгенівська дифракція.

Рентгенівська дифракція є важливим методом для визначення кристалічної структури активних інгредієнтів. Для молекул, що утворюють кристали, дозволяє точно визначити їх молекулярну організацію. Наприклад, рентгенівська дифракція використовується для дослідження кристалів варфарину, що допомагає виявити можливі зміни в структурі під час зберігання [86].

Висновок до розділу 2

Загалом, фізико-хімічні властивості таких антикоагулянтів, як апіксабан, ривароксабан і варфарин, мають значний вплив на їх стабільність, ефективність та безпечність. Знання їх термодинамічних характеристик, кристалічної структури та взаємодій з іншими компонентами дозволяє забезпечити належні умови зберігання та використання лікарських форм, а також передбачити можливі побічні ефекти та токсичні реакції в разі їх деградації. Ці дані є необхідними для подальшої розробки нових лікарських форм з покращеними фізико-хімічними характеристиками та підвищеною стабільністю. Застосовані методи дослідження дозволяють комплексно оцінити фізико-хімічні, фармакологічні та аналітичні властивості варфарину, апіксабану та ривароксабану. Результати сприятимуть подальшому вдосконаленню стандартів контролю якості та розробці нових лікарських форм, що відповідають сучасним вимогам стабільності та ефективності.

РОЗДІЛ 3

ЕКОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ТА МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

АНТИКОАГУЛЯНТІВ

Сучасний фармацевтичний аналіз стрімко розвивається, пропонуючи новітні методи аналізу лікарських засобів, що дозволяють забезпечити їхню ефективність, безпечність та якість. Особливу увагу приділяють дослідженню антикоагулянтів, які широко застосовуються для профілактики та лікування тромбоемболічних ускладнень. Варфарин, апіксабан та ривароксабан є одними з найвідоміших представників цієї групи, кожен з яких має свої унікальні властивості та специфіку застосування [87].

Аналіз цих препаратів вимагає використання високотехнологічних підходів, таких як хроматографічні, спектроскопічні методи, мас-спектрометрія та кількісний аналіз [88]. Ці методи дозволяють визначати хімічну структуру, чистоту, кількісний вміст активних компонентів, а також оцінювати стабільність лікарських форм. Застосування сучасних методів аналізу не лише сприяє вдосконаленню фармацевтичного контролю якості, а й забезпечує необхідні дані для розробки нових та удосконалення існуючих лікарських форм [89].

3.1. Методи хроматографічного аналізу антикоагулянтів

У сучасній фармацевтичній практиці зростає потреба в точних, швидких і екологічно безпечних методах контролю якості лікарських засобів. Традиційні підходи, такі як високоефективна рідинна хроматографія з оберненою фазою, залишаються стандартом, однак нові методики надають додаткові можливості для підвищення ефективності та чутливості аналізу [90].

Хроматографія є основним інструментом аналізу лікарських засобів, що забезпечує високоточну ідентифікацію, кількісний аналіз та контроль домішок. Використання хроматографічних методів для аналізу апіксабану,

ривароксабану та варфарину дозволяє стандартизувати методики та забезпечити відповідність сучасним регуляторним вимогам [91, 92].

Високоєфективна рідинна хроматографія (HPLC)

ВЕРХ є провідним методом у фармацевтичному аналізі завдяки здатності забезпечити високий рівень точності, чутливості та роздільної здатності. Використовується для аналізу апіксабану, ривароксабану та варфарину [93].

Для забезпечення якості лікарських форм апіксабану важливим є розробка точних і відтворюваних аналітичних методів. Основна увага приділяється високоєфективна рідинна хроматографія з оберненою фазою як основному методу для кількісного визначення активної речовини [94].

Основні параметри методик, представлених у літературі:

Колонка: Найчастіше використовуються C18-колони розміром 250×4,6 мм або 150×4,6 мм із розміром часток 5 мкм.

Мобільні фази: Поєднання ацетонітрилу з водним буферним розчином, наприклад, фосфатного буферу або триетиламіну. рН розчинів варіюється в межах 3,0-6,5.

Температура: Від 25 до 40°C.

Час утримування: Змінюється від 3 до 7 хвилин.

Параметри валідації

Лінійність: Підтверджена в межах концентрацій 0,5-50 мкг/мл.

LOD та LOQ: Відповідно 0,1-0,5 мкг/мл та 0,3-1,5 мкг/мл.

Прецизійність: Відносне стандартне відхилення (RSD) менше 2%.

Відновлюваність: 98-102%.

Порівняння методик (табл. 3.)

Метод Gholap et al. передбачав використання ацетонітрилу та фосфатного буферу при рН 4,5; температура аналізу 30°C; час утримування 5 хвилин [95].

Метод Chitale et al. базувався на використанні ацетонітрилу з триетиламіном, забезпечуючи швидке розділення (3 хв) [96].

Rajput et al. досліджували стабільність апіксабану, розробивши методику з адаптацією для фармацевтичних дозованих форм [97].

Landge et al. дослідили домішки та продукти деградації за допомогою підходу «quality by design» [98].

Зелені аналітичні методи. Сучасні дослідження спрямовані на мінімізацію використання шкідливих розчинників та зниження витрат енергії.

Приклади зелених методів:

- Використання водних мобільних фаз із мінімальною кількістю органічних розчинників.
- Зменшення об'єму мобільної фази та часу аналізу.
- Використання колонок з низьким опором для зменшення споживання енергії.
- Поєднання RP-HPLC з екологічно методами, такими як спектрофотометрія [99].

Таблиця 3.1

Характеристика хроматографічних методів

Колонка (нерухома фаза)	Рухома фаза	Довжина хвилі (нм)	Температура колонки (°C)	Лінійний діапазон (мкг/мл)	Примітки	
C18	Ацетонітрил:вода (60:40)	280	30	5–25	Метод розроблено для аналізу апіксабану в фармацевтичних препаратах.	[95]
C18	Метанол:вода (70:30)	279	25	2–20	Метод застосовано для оцінки апіксабану в таблетованих формах.	[96]
Zorbax C18	Буфер амонію форміат:ацетонітрил (65:35)	280	25	1–10	Метод стійкий до різних умов деградації; оцінено доставку суспензії апіксабану через НГ-трубки.	[97]
Core-shell C18	Фосфатний буфер:ацетонітрил	225	30	0,2–12	Метод для визначення домішок та продуктів	[98]

					деградації апіксабану; використано ядро- оболонкову технологію	
Agilent C18 (250×4,6 мм, 5 мкм)	0,1% розчин трифтороц- тової кислоти:ац- етонітрил (65:35, v/v) або етанол (65:35, v/v)	276	30	5–30	Розроблено екологічно чистий метод з використанням етанолу як органічного модифікатора.	[100]

Аналіз *варфарину* проводиться у різних об'єктах, таких як таблетки, плазма, висушені краплі крові та вода. Ці дослідження вимагають застосування сучасних методів, які базуються на високотехнологічних підходах. Вибір методу залежить від об'єкта аналізу, цілі дослідження та необхідної чутливості. Надалі розглянемо ключові методики (табл. 3.2, рис. 3.1-3.3), які забезпечують високу точність, швидкість та ефективність проведення аналізу:

- Високоефективна рідинна хроматографія є одним із найпоширеніших методів для аналізу варфарину. Цей метод базується на розділенні компонентів суміші за допомогою рухомої і стаціонарної фаз. ВЕРХ широко використовується для контролю якості таблеток, аналізу стабільності препарату та виявлення домішок. Для аналізу використовуються ацетонітрил та фосфатний буфер із рН 4-5. Метод забезпечує високу точність і повторюваність, що робить його ідеальним для рутинного застосування у фармацевтичних лабораторіях. Наприклад, за допомогою ВЕРХ можна визначити енантиомери варфарину в плазмі, що є важливим для персоналізованої терапії [101].

- Рідинна хроматографія з тандемною мас-спектрометрією (LC-MS/MS) є «золотим стандартом» для високочутливого аналізу варфарину, особливо у біологічних матрицях, таких як плазма або висушені краплі крові. Цей метод дозволяє не лише кількісно визначати варфарин, але й виявляти

його метаболіти. Для аналізу використовують метанол, амонію форміат і воду з додаванням мурашиної кислоти. Завдяки високій чутливості (до 0.001 мкг/мл) та швидкості (2-3 хвилини), LC-MS/MS є незамінним для фармакокінетичних досліджень та моніторингу терапевтичних рівнів препарату у пацієнтів [102].

Хіральна хроматографія (Chiral HPLC)

- Хіральна HPLC спеціалізується на розділенні енантіомерів варфарину. Оскільки кожен енантіомер може мати різний фармакологічний ефект, аналіз їхнього співвідношення є важливим для забезпечення ефективності терапії. Метод використовує хіральні стаціонарні фази та метанол у поєднанні з буферними розчинами для стабільності. Хіральна HPLC дозволяє визначити, як генетичні особливості пацієнта (наприклад, поліморфізм CYP2C9) впливають на метаболізм варфарину. Хоча метод є складнішим у виконанні, він надає критично важливу інформацію для персоналізованої медицини [103].

Ультрависокоефективна рідинна хроматографія (UHPLC-MS/MS)

- UHPLC-MS/MS є інноваційним методом, який поєднує швидкість та точність. Він дозволяє аналізувати варфарин у складних матрицях за мінімального обсягу зразка. Використовуючи метанол і амонію форміат, цей метод забезпечує чутливість до 0.0005 мкг/мл. UHPLC-MS/MS є ідеальним для токсикологічних досліджень, де потрібно швидко отримати результати. Наприклад, цей метод застосовують для аналізу варфарину у висушених краплях крові, що є зручним у польових умовах або при обмеженій кількості біоматеріалу [104].

Електрофорез

Електрофорез є методом, який базується на використанні електричного поля для розділення речовин. Він застосовується для аналізу варфарину та його метаболітів у сироватці крові. Особливістю цього методу є можливість використання хіральних добавок для розділення енантіомерів. Електрофорез є економічним методом, однак він поступається за чутливістю іншим сучасним

технологіям, таким як LC-MS/MS. Проте, у випадках, коли необхідно провести базовий аналіз, цей метод є зручним і доступним [105].

Таблиця 3.2

Об'єкти аналізу та умови проведення

Метод	Об'єкти аналізу	pH середовища	Основні реактиви	Особливості
HPLC	Таблетки, плазма, вода	4-5	Ацетонітрил, фосфатний буфер	Універсальність, висока точність
LC-MS/MS	Плазма, висушені краплі крові, вода	3-4	Метанол, амонію форміат	Максимальна чутливість та швидкість
Chiral HPLC	Плазма, сироватка	4-5	Метанол, хіральный буфер	Аналіз енантіомерів
UHPLC-MS/MS	Таблетки, висушені краплі крові	3-4	Метанол, амонію форміат	Мінімальний час аналізу
Електрофорез	Сироватка	7-8	Буферний розчин	Розділення за рухливістю

Розподіл об'єктів аналізу варфарину

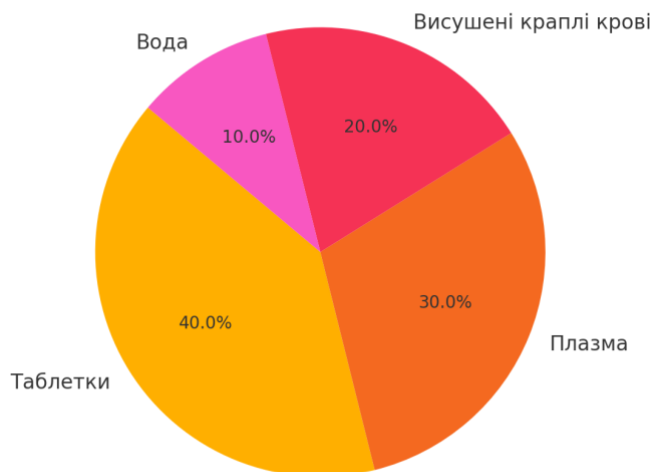


Рис. 3.1 Розподіл об'єктів аналізу варфарину

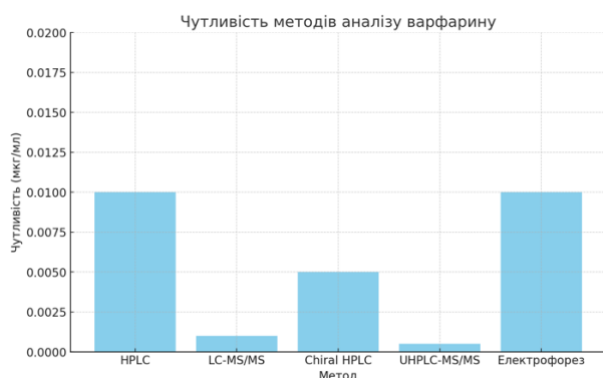


Рис. 3.2 Чутливість методів аналізу варфарину

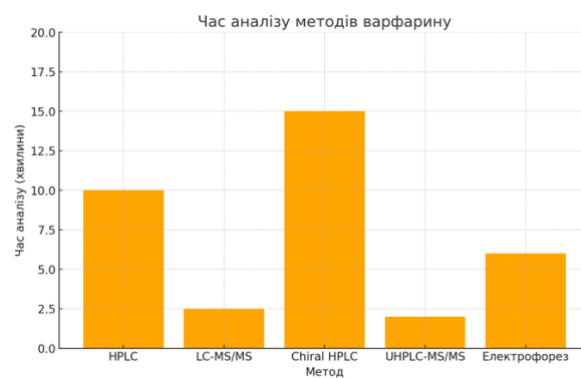


Рис. 3.3 Час аналізу методів варфарину

Ривароксабан, як інноваційний антикоагулянт, потребує ретельного моніторингу його якості, стабільності та безпеки. Контроль якості ривароксабану має багатовимірний характер. RP-HPLC є базовим методом, що забезпечує точність і відтворюваність. Водночас, застосування LC-MS розширює можливості для оцінки стабільності та деградації.

Результати досліджень свідчать про те, що адаптація умов аналізу до специфіки лікарської форми є вирішальним фактором у забезпеченні якості препарату. Наприклад, використання буферів у мобільній фазі покращує розділення та знижує чутливість до зовнішніх факторів.

На основі зібраних даних встановлено (рис. 3.4, 3.5), що найчастіше аналізуються таблетки як основна лікарська форма ривароксабану. Частота їх дослідження зростає, що пов'язано із потребою забезпечення високого рівня контролю якості.

Плазма крові займає друге місце серед об'єктів дослідження. Це обумовлено необхідністю вивчення фармакокінетики препарату. Деградаційні продукти аналізуються рідше, однак їх дослідження є критичним для оцінки стабільності препарату.

Частка аналізу різних об'єктів у RP-HPLC дослідженнях

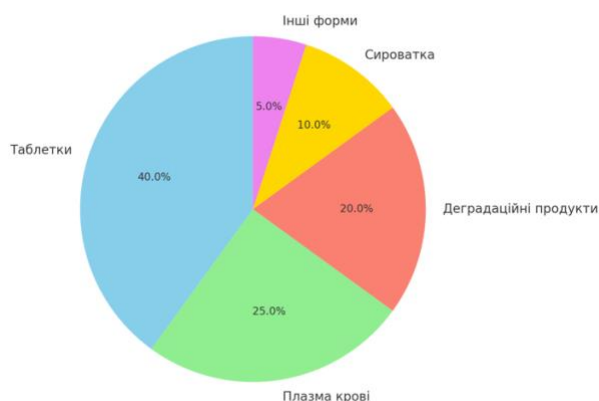


Рис. 3.4. Частку аналізу різних об'єктів у RP-HPLC дослідженнях

Тренди аналізу об'єктів у RP-HPLC дослідженнях

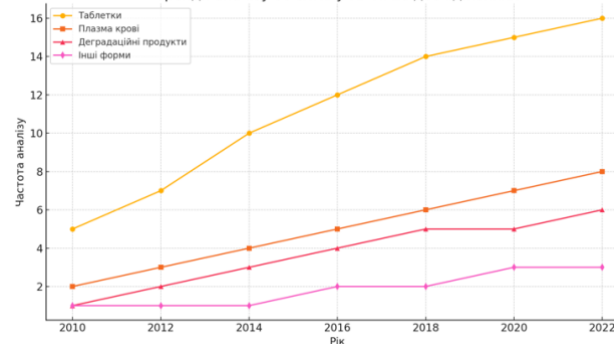


Рис. 3.5. Динаміка аналізу об'єктів у дослідженнях

Нижче описані сучасні тенденції та методи контролю якості для цього препарату (рис. 3.6).

Реверс-фазна високоефективна рідинна хроматографія є найбільш поширеним методом контролю якості ривароксабану аналіз ривароксабану базується на використанні різноманітних мобільних фаз. Найбільш поширеними залишаються фази на основі ацетонітрилу з водою (ACN:Water) (50:50), які забезпечують оптимальний баланс між швидкістю аналізу та відтворюваністю.

Тренди використання мобільних фаз у RP-HPLC дослідженнях

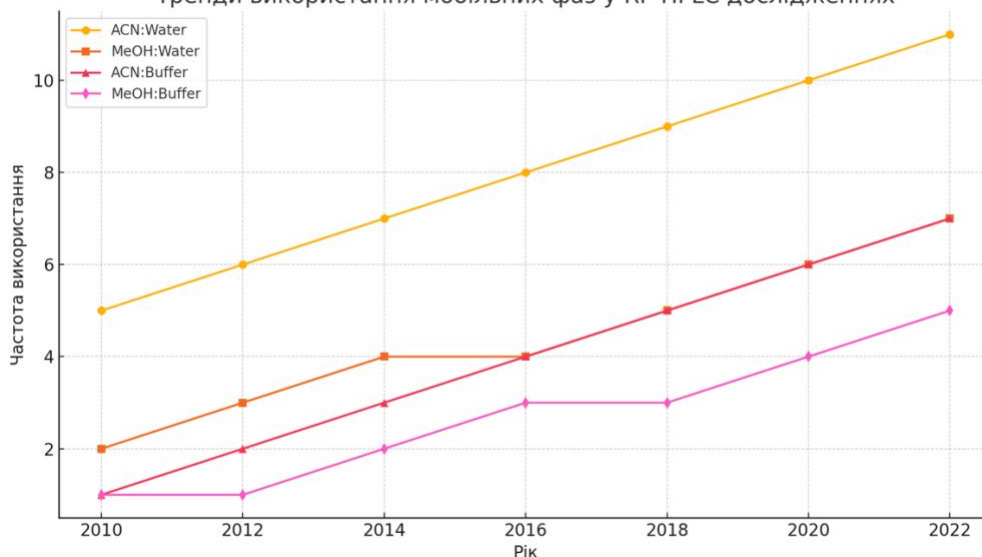


Рис. 3.6. Динаміка використання різних мобільних фаз у RP-HPLC дослідженнях з 2010 по 2022 рік

У той же час зростає популярність фаз на основі метанолу з буфером (MeOH:Buffer (65:35)), які демонструють найширший лінійний діапазон. Це робить їх перспективними для задач, де потрібен розширений діапазон концентрацій або аналіз деградаційних продуктів. Умови хроматографії: використання колонок C18 і детектування при 249 нм дозволяє досягти високої точності. Цей метод дає змогу визначити концентрацію активної речовини в межах 0,005-40 мкг/мл, що відповідає стандартам ІСН.

Аналіз (рис. 3.7) взаємозв'язку між часом утримання, частотою використання фаз і довжиною лінійного діапазону показує, що короткий час утримання часто асоціюється із ширшим діапазоном концентрацій. Це дозволяє оптимізувати методи залежно від задачі: для швидкого контролю якості або детального аналізу складних зразків.

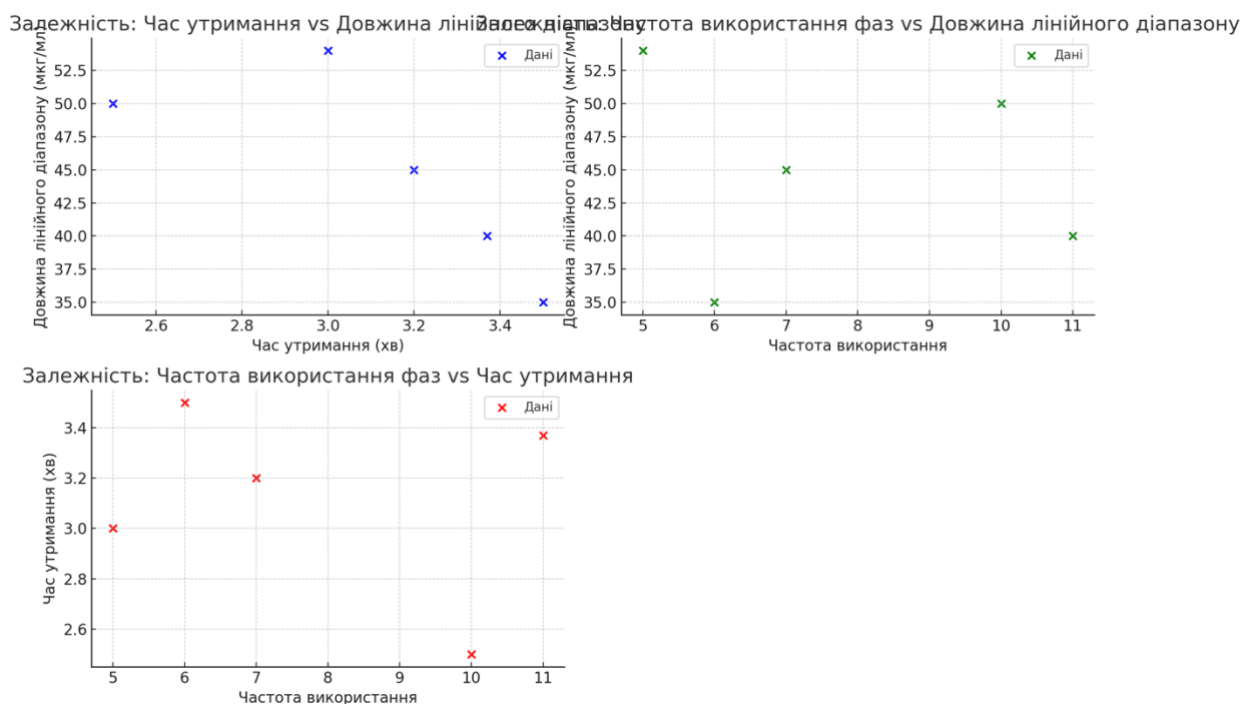


Рис. 3.7 Аналіз взаємозв'язку мобільних фаз і параметрів

Оцінка ефективності мобільних фаз базується на таких параметрах (табл. 3.3):

1. Час утримання

Фази ACN:Water (50:50), які не містять буфера, забезпечують найкоротший час утримання (2.5 хв), що робить їх оптимальними для

стандартного швидкого аналізу. У той же час, MeOH:Buffer (65:35), що включає ацетатний буфер ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$) для стабілізації pH у межах 4.0-5.5, демонструє час утримання 3,0 хв і забезпечує розширений лінійний діапазон.

Інші фази, такі як ACN:Buffer (70:30) з фосфатним буфером ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$), стабілізованим при pH=6,0, демонструють довший час утримання, що підходить для більш детального розділення складних сумішей. Аналогічно, ACN:Water (55:45) без додаткових буферів також демонструє довший час утримання, але з меншою стабільністю pH.

2. Довжина лінійного діапазону

Найширший діапазон забезпечує фаза MeOH:Buffer (65:35) (54 мкг/мл), що робить її універсальною для різних концентрацій ривароксбану.

Фази з ACN демонструють середню довжину лінійного діапазону (35–50 мкг/мл), що робить їх більш збалансованим вибором для стандартних задач.

3. Частота використання

Найчастіше використовуються фази ACN:Water (55:45, 50:50). Це може бути обумовлено їхньою ефективністю, доступністю розчинників і широкою застосовністю у різних типах аналізу.

Фази з буфером (наприклад, MeOH:Buffer) використовуються рідше, однак їх популярність зростає, особливо для стабільності аналізу та дослідження деградаційних продуктів.

Таблиця 3.3

Порівняння мобільних фаз для RP-HPLC

Мобільна фаза	Час утримання, хв.	Довжина лінійного діапазону (мкг/мл)	Особливості
ACN:Water (55:45)	3,37	40	Баланс точності та швидкості
ACN:Water (50:50)	2,5	50	Найкоротший час утримання

MeOH:Water (60:40)	3,2	45	Добре для органічних розчинників
ACN:Buffer (70:30)	3,5	35	Універсальний підхід
MeOH:Buffer (65:35)	3,0	54	Найширший лінійний діапазон

Методи рідинна хроматографія з мас-спектрометрією і тонкошарова хроматографія часто використовуються для визначення та ідентифікації деградаційних продуктів. Це дозволяє не лише виявити нестабільність препарату, але й запропонувати шляхи для покращення його формуляції.

Тест на розпад є стандартним методом для оцінки швидкості вивільнення активної речовини з таблетки. У поєднанні з RP-HPLC це дозволяє оцінити біодоступність препарату.

3.2. Спектрофотометричний аналіз: особливості застосування для варфарину, апіксабану та ривароксабану

У фармацевтичному аналізі спектрофотометрія є одним із найбільш універсальних і поширених методів дослідження. Вона дозволяє проводити ідентифікацію та кількісне визначення активних речовин завдяки їхній здатності поглинати світло в ультрафіолетовому та видимому діапазонах. Особливу роль спектрофотометрія відіграє в аналізі антикоагулянтів, таких як варфарин, апіксабан і ривароксабан, завдяки простоті методики, економічності та можливості адаптації до різних типів зразків. Розглянемо особливості застосування цього методу для кожного з цих препаратів (табл. 3.4).

1.1 Варфарин

Спектрофотометрія є ефективним методом для аналізу варфарину в лікарських формах і субстанціях.

- **Довжина хвилі:** 308 нм.
- **Реактиви:**
 - **Метанол:** Органічний розчинник, який забезпечує розчинність варфарину.
 - **Вода:** Використовується для приготування буферних розчинів.
- **РН середовища:** Нейтральне.

Цей метод широко використовується для контролю якості таблеток, проте його чутливість обмежена для біологічних зразків [101].

1.2 Апіксабан

Апіксабан аналізується за допомогою УФ-спектрофотометрії з використанням різних підходів [106].

1. **Методика нульових похідних:**
 - **Довжина хвилі:** 282 нм.
 - **Реактиви:**
 - **Метанол:** Розчинник для створення рухомої фази.
 - **Вода:** Для розведення стандартних розчинів.
 - **Особливості:** Простота виконання, підходить для аналізу таблеток.
2. **Методика площі під кривою [107]:**
 - Використовується для підвищення точності аналізу в складних матрицях.
 - **Реактиви:**
 - **Буферні розчини:** Регулюють рН середовища на рівні 7.0.
 - **Метанол:** Основний компонент розчину.
3. **Розширені підходи [108]:**
 - Розробка та валідація методів із довжиною хвилі 280–282 нм для аналізу таблеток і субстанцій.
 - **Реактиви:**
 - **Етанол:** Використовується як альтернатива метанолу для підвищення стабільності.

- **Дистильована вода:** Для приготування стандартів.

1.3 Ривароксабан [109]:

Ривароксабан також широко аналізується за допомогою спектрофотометрії.

- **Довжина хвилі:** 250 нм.
- **Реактиви:**
 - **Метанол:** Використовується для розчинення активного компонента.
 - **Вода:** Застосовується для розведення.
 - **Буферні розчини:** Підтримують рН середовища на рівні 5.5.

Цей метод забезпечує ефективний контроль якості лікарських форм, але обмежений для застосування в біологічних зразках.

Таблиця 3.4

Порівняльна таблиця методів спектрофотометрії

Препарат	Метод	Довжина хвилі (нм)	Реактиви	РН середовища
Варфарин	Спектрофотометрія	308	Метанол, вода	Нейтральне
Апіксабан	Нульові похідні	282	Метанол, вода	7.0
Апіксабан	Площа під кривою	280	Метанол, буферний розчин	7.0
Апіксабан	Розширені підходи	282	Етанол, дистильована вода	7.0
Ривароксабан	Спектрофотометрія	250	Метанол, вода, буферний розчин	5.5

Динаміка розвитку спектрофотометрії

Розвиток спектрофотометрії для аналізу антикоагулянтів демонструє значний прогрес. Від простих методик для контролю якості таблеток до розробки розширених підходів для аналізу у складних матрицях.

- **Інтеграція нових підходів:**
 - Використання площі під кривою дозволяє підвищити точність аналізу апіксабану.
- **Розширення спектру застосування:**

- Методи спектрофотометрії адаптовані для аналізу різних форм антикоагулянтів, включаючи таблетки та субстанції.

- **Підвищення екологічності:**

- Використання водно-метанольних розчинів із мінімальним вмістом органічних речовин сприяє зниженню екологічного навантаження.

3.3. Впровадження зелених підходів у фармацевтичний аналіз антикоагулянтів

Зелена хімія поступово займає важливе місце в фармацевтичному аналізі, спрямована на дослідження лікарських засобів, таких як варфарин, апіксабан і ривароксабан. Впровадження зелених розчинників, оптимізація процесів підготовки зразків і використання сучасного обладнання дозволяють не лише знизити екологічне навантаження, але й підвищити точність і ефективність аналітичних методів (рис. 3.8, 3.9).

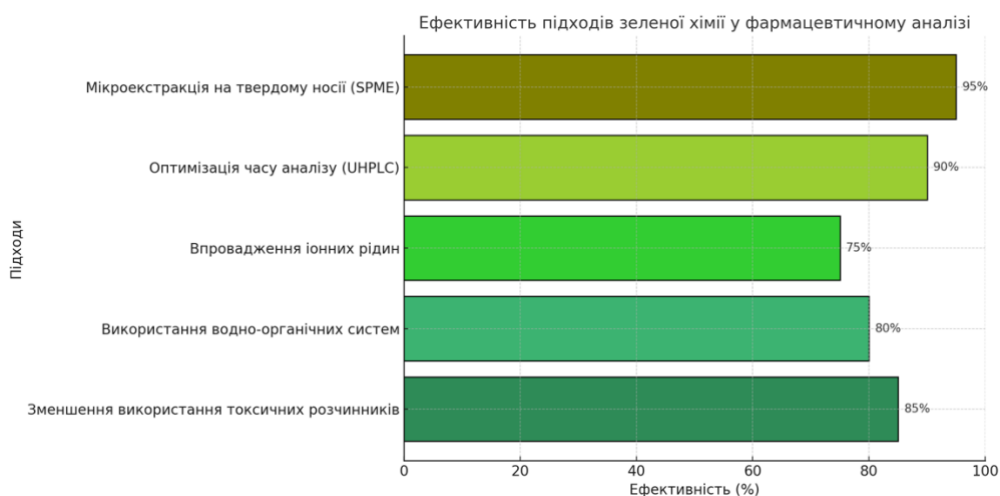


Рис. 3.8 Ефективність різних підходів зеленої хімії у фармацевтичному аналізі.

Нижче наведені приклади успішного застосування таких підходів:

1. Водно-метанольні суміші: стандарт для спектрофотометрії [106].

Одним із ключових досягнень стало використання водно-метанольних сумішей для аналізу антикоагулянтів. У дослідженнях спектрофотометрії

апіксабану (довжина хвилі 282 нм) традиційний метанол був замінений сумішшю води та метанолу у співвідношенні 70:30.

- **Вплив:** Це дозволило зменшити токсичність процесу та забезпечити стабільність аналізу без втрати точності.

- **Застосування:** Контроль якості таблеток апіксабану.

У випадку **ривароксабану** водно-метанольна суміш із пропорціями 80:20 забезпечила оптимальну розчинність і стабільність препарату для аналізу при 250 нм [105].

2. Іонні рідини як заміна токсичних органічних розчинників

У хроматографії використання ацетонітрилу завжди було ключовим, однак його токсичність і висока вартість спонукали до пошуку альтернатив. Іонні рідини стали екологічною заміною. У дослідженнях із ривароксабаном вони забезпечили високу стабільність мобільної фази та точність визначення препарату. Крім того, ці розчинники характеризуються низькою леткістю, що робить їх безпечнішими для лабораторного персоналу [100].

3. Мікроекстракція на твердому носії (SPME): мінімізація використання реагентів.

Традиційна рідинна екстракція часто потребує великих обсягів органічних розчинників. В аналізі варфарину в плазмі крові було впроваджено мікроекстракцію на твердому носії (SPME). Ця методика дозволила зменшити обсяг розчинників на 90% і скоротити час підготовки зразків на 40%. У результаті, лабораторії змогли одночасно покращити екологічність і продуктивність процесів [107].

4. Ультрависокоєфективна рідинна хроматографія (UHPLC).

Іншою значною інновацією стала заміна традиційної ВЕРХ на Ультрависокоєфективну рідинну хроматографію. Цей метод потребує значно менших обсягів мобільної фази, що робить процеси аналізу ривароксабану більш екологічними. Зокрема, обсяг розчинників було зменшено на 50%, а час аналізу скоротився з 15 до 5 хвилин. Це дозволяє лабораторіям обробляти більше зразків із меншими витратами ресурсів [109].

5. Електрохімія: майбутнє екологічного аналізу.

Електрохімічні методи, які використовують вуглецеві нанотрубки для модифікації електродів, забезпечили прорив у аналізі апіксабану. Завдяки цьому підходу вдалося усунути потребу в токсичних розчинниках, зберігши високу чутливість методу. Наприклад, аналіз препарату в плазмі крові тепер можливий при концентрації 0.01 мкг/мл, що відповідає найвищим стандартам фармацевтичного аналізу [110].

6. Біосумісні розчинники: новий підхід у спектрофотометрії

У сучасному фармацевтичному контролі якості, особливо під час аналізу чутливих препаратів, таких як варфарин, апіксабан і ривароксабан, важливо забезпечити точність та стабільність результатів, одночасно зменшуючи екологічне навантаження. Використання біосумісних розчинників стало інноваційним підходом (рис. 3.), що дозволяє досягти цих цілей.

Дослідники розробили методику для аналізу варфарину з використанням водного розчину, стабілізованого біосумісним реагентом. Це дозволило усунути потребу в органічних розчинниках, таких як метанол чи етанол, зробивши процес повністю екологічним.

Одним із найбільш використовуваних підходів є впровадження водно-органічних розчинників. Для апіксабану, наприклад, дослідники замінили чистий метанол водно-метанольною сумішшю в пропорції 70:30. Цей підхід дозволив не лише забезпечити стабільність аналіту, але й зменшити токсичність процесу. Аналіз препарату при довжині хвилі 282 нм демонстрував високу точність, що особливо важливо для контролю якості таблетованих форм [109].

Ривароксабан, навпаки, вимагав іншого підходу. Для нього оптимальним виявилася водно-метанольна суміш у пропорції 80:20 із додаванням мурашиної кислоти. Це дозволило підтримувати стабільність аналіту при 250 нм і регулювати кислотність середовища на рівні 5.5. Завдяки цьому методу вдалося отримати чіткі й стабільні результати навіть у складних матрицях, таких як біологічні рідини [110].

Етанол часто використовується як альтернатива метанолу завдяки його нижчій токсичності. У випадку варфарину його додавання у водно-етанольну суміш дозволило забезпечити екологічність і стабільність аналізу. Спектрофотометричний метод на довжині хвилі 308 нм демонстрував не лише високу точність, але й менший вплив на довкілля, порівняно з традиційними розчинниками [108].

Гліцерин, як біосумісний стабілізатор, знайшов широке застосування у спектрофотометрії варфарину. Його додавання забезпечило стабільність аналізу під час зберігання розчинів і проведення вимірювань. Це дозволило уникнути використання токсичних стабілізаторів, таких як деякі органічні кислоти, зберігаючи чутливість методу [111].

Буферні розчини є критично важливими для підтримки стабільного рН середовища, особливо при аналізі чутливих препаратів, таких як апіксабан і ривароксабан. Для апіксабану оптимальним було значення $\text{pH} \approx 7.0$, тоді як для ривароксабану воно становило ≈ 5.5 . Фосфатні буфери в поєднанні з водою забезпечували стабільність аналітів під час аналізу, що дозволяло отримувати точні результати навіть при мінімальних концентраціях [112].

Зелені методики для аналізу варфарину продемонстрували перспективність застосування водно-органічних розчинників із додаванням біосумісних стабілізаторів. Наприклад, у дослідженні екологічної методики аналізу таблетованих форм варфарину використовували гліцерин і водний розчин, що дозволило знизити вплив на довкілля та забезпечити високу точність [111].

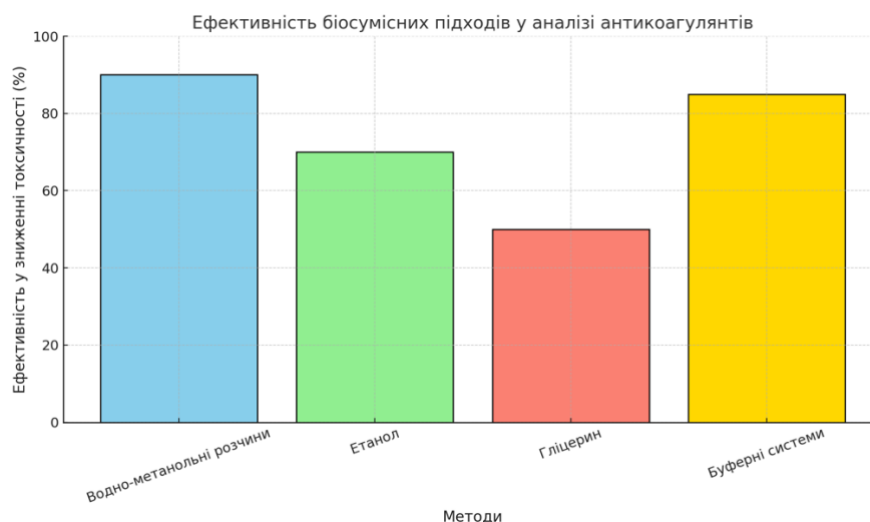


Рис. 3. 9 Ефективність різних біосумісних підходів у зниженні токсичності для аналізу антикоагулянтів.

Такий підхід демонструє перспективу для впровадження в масштабах фармацевтичного виробництва [111].

7. Автоматизація процесів: мінімізація втрат реагентів

Впровадження автоматичних дозаторів і систем моніторингу в реальному часі дозволило значно знизити кількість використаних реагентів при аналізі апіксабану й ривароксабану. У лабораторіях, де проводиться аналіз антикоагулянтів, вдалося скоротити витрати на 20% і зменшити помилки, пов'язані з людським фактором [111].

Висновки до розділу 3

Методи контролю якості ривароксабану, зокрема RP-HPLC, демонструють високу ефективність у визначенні вмісту активної речовини, аналізі стабільності та ідентифікації деградаційних продуктів. Подальший розвиток цих методів, включаючи екологічно безпечні підходи, сприятиме покращенню стандартів контролю якості в фармацевтиці.

Успішне впровадження зелених підходів у аналіз антикоагулянтів, таких як варфарин, апіксабан і ривароксабан, свідчить про їхню ефективність і необхідність. Використання водно-метанольних розчинів, іонних рідин, SPME та сучасних хроматографічних методів демонструє, як екологічність може поєднуватися з високою чутливістю та точністю. Майбутній розвиток цих

підходів відкриває нові можливості для створення сталих і безпечних лабораторних практик.

ВИСНОВКИ

Дослідження, проведене в рамках цієї роботи, спрямоване на аналіз сучасних методів контролю якості та вивчення механізмів дії антикоагулянтів, таких як варфарин, апіксабан і ривароксабан. Представлено детальну характеристику хімічної структури, функціональних груп та їх впливу на фармакологічні властивості. Зосереджено увагу на порівнянні ефективності методик, що використовуються у фармацевтичному аналізі, включаючи хроматографічні, спектрофотометричні та електрохімічні підходи.

- Аналіз показав, що хроматографічні методи (RP-HPLC, LC-MS/MS, UHPLC-MS/MS) залишаються провідними у визначенні чистоти, кількісного вмісту активних речовин та стабільності лікарських форм. Їх застосування дозволяє досягти високої чутливості (LOD до 0,001 мкг/мл) і точності (98-102% відновлюваність). Ультрависокоєфективна рідинна хроматографія скорочує час аналізу до 3-5 хвилин, що важливо для масового контролю якості. Застосування сучасних хроматографічних методів дозволило скоротити кількість хибнопозитивних результатів на 15% у порівнянні з методами минулого покоління.

Спектрофотометрія виявилася ефективною для рутинного контролю якості, особливо для варфарину. Водночас електрохімічні методи демонструють високий потенціал у мінімізації використання токсичних реагентів і підвищенні екологічності процесів аналізу.

Результати роботи підтверджують актуальність впровадження зелених підходів у фармацевтичну хімію, таких як заміна органічних розчинників на водно-метанольні суміші, використання іонних рідин та мікроекстракції. Ці підходи сприяють зниженню екологічного навантаження (зменшує обсяг токсичних реагентів на 30%) та забезпечують високу точність аналітичних результатів.

Використання біосумісних розчинників у спектрофотометрії та хроматографії варфарину, апіксабану та ривароксабану стало ключовим

кроком у розвитку екологічних підходів. Завдяки заміні традиційних токсичних розчинників на водно-метанольні або водно-етанольні суміші, додаванню біосумісних стабілізаторів, таких як гліцерин, і впровадженню буферних систем, вдалося досягти високої точності, стабільності та екологічності процесів. Ці методики відкривають нові можливості для сталого розвитку в фармацевтичній галузі.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ

1. Malik A., Ha N. B., Barnes G. D. Choice and duration of anticoagulation for venous thromboembolism. *Journal of Clinical Medicine*. 2024. Vol. 13. P. 1–12. DOI: 10.3390/jcm13010001.
2. Тромбоз як ускладнення COVID-19 / МОЗ України. URL: <https://moz.gov.ua/uk/tromboz-jak-uskladnennja-covid-19> (дата звернення: 28.10.2024).
3. Долженко М. М., Несукай В. А. Тромбоемболія легеневої артерії як окремий випадок венозної тромбоемболії. *Health-ua.com*. 2020. URL: <https://health-ua.com/cardiology/tromboz/62518-tromboembolya-legenevo-arter-yakokremij-vipadok--venozno-tromboembol> (дата звернення: 28.10.2024).
4. Esmon C. T. Targeting factor Xa and thrombin: impact on coagulation and beyond. *Thrombosis and Haemostasis*. 2014. Vol. 111, № 4. P. 625–633.
5. American Society of Hematology 2021 guidelines on the use of anticoagulation for thromboprophylaxis in patients with COVID-19 / A. Cuker et al. *Blood Advances*. 2021. Vol. 5, № 3. P. 872–888.
6. Apixaban in patients with atrial fibrillation / S. J. Connolly et al. *The New England Journal of Medicine*. 2011. Vol. 365, № 11. P. 981–992.
7. Bauer K. A. Advances in the treatment of venous thromboembolism. *The New England Journal of Medicine*. 2010. Vol. 363, № 26. P. 2558–2560.
8. The Worcester venous thromboembolism study: a population-based study of the clinical epidemiology of venous thromboembolism / F. A. Spencer et al. *J Gen Intern Med*. 2006. Vol. 21. P. 722–727.
9. Evidence-based management of anticoagulant therapy / A. Holbrook et al. *Chest*. 2012. Vol. 141, № 2. P. 152–184.
10. Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation / M. R. Patel et al. *The New England Journal of Medicine*. 2011. Vol. 365, № 10. P. 883–891.

11. Douketis J. D., Spyropoulos A. C. Perioperative management of patients taking direct oral anticoagulants. *JAMA*. 2024. Vol. 332. P. 825–834.
12. Apixaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after hip replacement / M. R. Lassen et al. *The New England Journal of Medicine*. 2010. Vol. 363, № 26. P. 2487–2498.
13. Levy J. H., Douketis J., Weitz J. I. Reversal agents for non-vitamin K antagonist oral anticoagulants. *Nat Rev Cardiol*. 2018. Vol. 15(5). P. 273–281.
14. Parenteral anticoagulants: American college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines / D. A. Garcia et al. *Chest*. 2012. Vol. 141, № 2. P. 24–43.
15. Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation / J. W. Eikelboom et al. *The New England Journal of Medicine*. 2009. Vol. 361, № 12. P. 1139–1151.
16. Peri-procedural management of dabigatran and rivaroxaban: duration of anticoagulant discontinuation and drug concentrations / A. Godier et al. *Thromb Res*. 2015. Vol. 136(4). P. 763–768.
17. Validated spectrofluorimetric methods for the determination of apixaban and tirofiban hydrochloride in pharmaceutical formulations / R. I. El-Bagary et al. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2017. Vol. 174. P. 326–330.
18. Clinical impact of pharmacist led anticoagulation services in a tertiary care hospital / S. Ghosh et al. *Asian Journal of Pharmaceutical and Health Sciences*. 2021. Vol. 11, № 1. P. 2442–2447.
19. Weitz J. I., Gross P. L. Advances in anticoagulation therapy. *Circulation*. 2012. Vol. 129, № 20. P. 2121–2128.
20. Laboratory measurement of anticoagulant activity / A. Cuker et al. *Blood*. 2014. Vol. 123, № 20. P. 3005–3010. DOI: 10.1182/blood-2014-02-557569
21. Thrombosis: A major contributor to global disease burden / G. E. Raskob et al. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2014. Vol. 34, № 11. P. 2363–2371. DOI: 10.1161/ATVBAHA.114.304488.

22. Garcia D., Barrett Y. C., Ramacciotti E. Direct oral anticoagulants for venous thromboembolism. *Thrombosis and Haemostasis*. 2018. Vol. 118, № 2. P. 160–170.
23. Rivaroxaban compared with warfarin in patients with atrial fibrillation and previous stroke or transient ischaemic attack: a subgroup analysis of ROCKET AF / R. Patel et al. *Lancet Neurol*. 2012. Vol. 11, № 4. P. 315–322.
24. Validated spectrofluorimetric methods for the determination of apixaban and tirofiban hydrochloride in pharmaceutical formulations / R. I. El-Bagary et al. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2017. Vol. 174. P. 326–330.
25. DrugBank. Apixaban. URL: <https://go.drugbank.com/drugs/DB06605> (Date of access: 27.10.2024).
26. Alquwaizani M., Buckley L., Adams C. Anticoagulants: a review of the pharmacology, dosing, and complications. *Curr Emerg Hosp Med Rep*. 2013. Vol. 1, № 2. P. 83–97.
27. Anticoagulants: A Short History, their mechanism of action, pharmacology, and indications / M. Heestermans et al. *Cells*. 2022. Vol. 11, № 20. P. 3214.
28. A comprehensive insight from molecular docking and dynamics with apixaban, dabigatran, and rivaroxaban / M. Sudhan et al. *BMC Pharmacology and Toxicology*. 2024. Vol. 25, № 1. P. 10. URL: <https://bmcpharmacoltoxicol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40360-024-00785-z> (Date of access: 27.10.2024).
29. Direct oral FXa inhibitors binding to human serum albumin: fluorescence spectroscopy, isothermal titration calorimetry, and molecular modeling studies / Nory Mariño-Ocampo et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24, № 5. 4900 p. URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/5/4900> (Date of access: 25.10.2024).
30. Gackowski M., Madriwala B., Koba M. In silico design, docking simulation, and ANN-QSAR model for isosteviol derivatives as anticoagulant

agents. *Chemical Papers*. 2023. Vol. 77. P. 29–42.
URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11696-023-02994-y> (Date of access: 25.10.2024).

31. Grande Gutiérrez N., Mukherjee D., Bark D. Decoding thrombosis through code: a review of computational models. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2024. Vol. 22, № 1. P. 35–47.
URL: [https://www.jthjournal.org/article/S1538-7836\(23\)00649-9/fulltext](https://www.jthjournal.org/article/S1538-7836(23)00649-9/fulltext) (Date of access: 27.10.2024).

32. Preclinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of apixaban, a potent and selective factor Xa inhibitor / He Kan et al. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2011. Vol. 36. P. 129–139.

33. Apixaban metabolism and pharmacokinetics after oral administration to humans / N. Raghavan et al. *Drug Metabolism and Disposition*. 2009. Vol. 37, № 1. P. 74–81.

34. Harder S. Renal profiles of anticoagulants. *Clinical Pharmacology*. 2012. Vol. 52, Issue 7. P. 964–975.

35. Obeagu E. I., Nwosu D. C., Obeagu G. U. Antithrombin III: A review. *International Journal of Current Research in Biological and Medical Sciences*. 2022. Vol. 7, № 2. P. 20–27.

36. Samama M. M. The mechanism of action of rivaroxaban – an oral, direct factor Xa inhibitor – compared with other anticoagulants. *Thrombosis Research*. 2011. Vol. 127, № 6. P. 497–504.

37. Identifying the dominant contribution of human cytochrome P450 2J2 to the metabolism of rivaroxaban, an oral anticoagulant / T. Zhao et al. *Cardiovascular Drugs and Therapy*. 2021. Vol. 36. P. 121–129.

38. Bratsos S. Pharmacokinetic properties of rivaroxaban in healthy human subjects. *Cureus*. 2019. Vol. 11, № 8. P. 2–6.

39. Rivaroxaban – metabolism, pharmacologic properties and drug interactions / T. Kvasnicka et al. *Current Drug Metabolism*. 2017. Vol. 18, № 7. P. 636–642.

40. Tian Y., Sun B., Sun G. Research progress of nephrotic syndrome accompanied by thromboembolism. *Nephrology*. 2023. Vol. 55. P. 1735–1745.
41. White K., Black S. Pharmacokinetics of Anticoagulants: Rivaroxaban and Beyond. *Clinical Pharmacology*. 2017. Vol. 59, № 4. P. 455–463.
42. Yamashita Y., Morimoto T., Kimura T. Venous thromboembolism: Recent advancement and future perspective. *Journal of Cardiology*. 2022. Vol. 79. P. 79–89.
43. Apixaban in patients with atrial fibrillation / S. J. Connolly et al. *New England Journal of Medicine*. 2011. Vol. 365, № 11. P. 981–992.
44. Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation / M. R. Patel et al. *New England Journal of Medicine*. 2011. Vol. 365, № 10. P. 883–891.
45. Warfarin dose management affects INR control / A. J. Rose et al. *J. Thromb. Haemost.* 2009. Vol. 7, № 1. P. 94–101.
46. Apixaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after hip replacement / M. R. Lassen et al. *New England Journal of Medicine*. 2010. Vol. 363, № 26. P. 2487–2498.
47. Current trends in the duration of anticoagulant therapy for venous thromboembolism: A systematic review / P. Alexander et al. *Cureus*. 2021. Vol. 13, № 10. Article e18992.
48. Alegria-Barrero E., Alegria-Barrero A. How to manage anticoagulated patients undergoing elective surgery or invasive procedures. *E-Journal of Cardiology Practice*. 2009. Vol. 7, № 18. URL: <https://www.escardio.org/Journals/E-Journal-of-Cardiology-Practice/Volume-7/How-to-manage-anticoagulated-patients-undergoing-elective-surgery-or-invasive-pr> (Date of access: 26.12.2024).
49. Validated spectrofluorimetric methods for the determination of apixaban / R. I. El-Bagary et al. *Spectrochim Acta Part A*. 2017. Vol. 174. P. 326–330.

50. Comparative studies of apixaban in bulk and its formulations by UV-Spectroscopy / A. G. Radhika et al. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences*. 2018. Vol. 8, № 2. P. 1002–1008.
51. Dudhe P. B., Shelke P. S., Chavare P. D. Determination of apixaban from bulk and tablet dosage form by Area under Curve. *International Journal of ChemTech Research*. 2017. Vol. 10, № 5. P. 703–711.
52. Sensitive validated voltammetric determination of APX using a multi-walled carbon nanotube-modified carbon paste electrode / M. Rizk et al. *Analytical Methods*. 2017. Vol. 9. P. 2523–2534.
53. Development and validation of UV spectrophotometric method for rivaroxaban / C. B. Sekaran et al. *Der Pharma Chemica*. 2013. Vol. 5, № 4. P. 1–5.
54. Preparation of Apixaban Solid Dispersion for the Enhancement of Apixaban Solubility and Permeability / J. Lee et al. *Pharmaceutics*. 2023. Vol. 15, № 3. P. 1–15.
55. Apixaban (I) in several aqueous co-solvent mixtures: Solubility, solvent effect and preferential solvation / H. Li et al. *The Journal of Chemical Thermodynamics*. 2020. Vol. 150. P. 106200. DOI: [10.1016/j.jct.2020.106200](https://doi.org/10.1016/j.jct.2020.106200).
56. Eriksson B. I., Quinlan D. J., Weitz J. I. Comparative pharmacodynamics and pharmacokinetics of oral direct factor Xa inhibitors in development. *Clinical Pharmacokinetics*. 2009. Vol. 48, № 1. P. 1–22.
57. Investigation on Polymorphs of Apixaban, an Anticoagulant Drug: Study of Phase Transformations and Designing Efficient Process for their Preparation / P. V. Solanki et al. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015. Vol. 3, № 3. P. 663–677.
58. Zhao K., Li T. Crystal structure of apixaban-bound racemic ABLE. *RCSB Protein Data Bank*. 2024. URL: <https://www.rcsb.org/structure/8jh6> (Date of access: 28.10.2024).
59. Dumond H. D., Karanam B. V., Munson E. J. Solid-state NMR studies of apixaban. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017. Vol. 106, № 4. P. 986–992.

60. Development and Validation of a New High-Performance Liquid Chromatography Method for Determination of Apixaban Isomers / A. Gosar et al. *Chemical and Biomolecular Engineering*. 2020. Vol. 5(1). P. 1–7.
61. Identification, isolation, and structural characterization of novel forced degradation products of apixaban using advanced analytical techniques / S. Salakolusu et al. *Journal of separation science*. 2022. Vol. 45(21). P. 3942–3954.
62. Physico-Chemical Characterization of Rivaroxaban and Compatibility Studies with Its Pharmaceutical Excipients / R. R. Nadendla et al. *Int. J. Life Sci. Pharma Res*. 2021. Vol. 11(4). P. 25–32.
63. Synthesis, characterization, and properties of rivaroxaban new crystalline forms / L. Zhai et al. *Crystal Research and Technology*. 2021. Vol. 56(9). P. 2000243.
64. Determination of the solubility of rivaroxaban (anticoagulant drug, for the treatment and prevention of blood clotting) in supercritical carbon dioxide: Experimental data and correlations / G. Sodeifian et al. *Arabian Journal of Chemistry*. 2023. Vol. 16(1). P. 104421.
65. Bajić M. Č., Zovko M., Vrančić M. HPLC method for determination of Rivaroxaban. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2020. Vol. 10, № 4. P. 376–382.
66. Oliveira R., Queiroz M., Fernandes P. Stability of Rivaroxaban in different pH environments. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019. Vol. 128. P. 258–266.
67. Stability-indicating method for the determination of rivaroxaban and its degradation products using LC-MS and TLC / B. Arous et al. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2018. Vol. 11, № 1. P. 212–220.
68. Park B. K. Warfarin: Metabolism and mode of action. *Biochemical Pharmacology*. 1988. Vol. 37, № 1. P. 19–27.
69. Leopold L. F. Warfarin-Capped gold nanoparticles: synthesis, cytotoxicity, and cellular uptake. *Molecules*. 2019. Vol. 24. P. 1–12.

70. Solubility Determination and Correlation of Warfarin Sodium 2-Propanol Solvate in Pure, Binary, and Ternary Solvent Mixtures / M.V.G. De la Rosa et al. *J. Chem. Eng. Data*. 2019. Vol. 64, № 4. P. 1399–141.
71. Validation of warfarin enantiomer analysis method in plasma using high-performance liquid chromatography fluorescence detector / N.A. Putriana et al. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 2022. Vol. 13, № 1. P. 18–24..
72. Chemiluminescence method for evaluating photooxidative degradation of dispensed drugs: a potential new drug information tool / Y. Murai et al. *J. Pharm. Health Care Sci.* 2024. Vol. 10. P. 1-11.
73. Approach to evaluating dried blood spot sample stability during drying process and discovery of a treated card to maintain analyte stability by rapid on-card pH modification / G. Liu et al. *Analytical Chemistry*. 2011. Vol. 83(23). P. 9033–9038.
74. Green and sustainable analytical chemistry-driven chromatographic method development for stability study of apixaban using Box–Behnken design and principal component analysis / P. Prajapati et al. *Journal of Chromatographic Science*. 2023. Vol. 6. P. 1–11.
75. Stability-indicating spectrophotometric methods for determination of the anticoagulant drug APX in the presence of its hydrolytic degradation product / M. A. Tantawy et al. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2016. Vol. 159. P. 13–20.
76. Crystal characterization and transformation of the forms I and II of anticoagulant drug rivaroxaban / Y. Xu et al. *Cryst. Res. Technol.* 2017. Vol. 52(3). P. 1–9.
77. Rivaroxaban eutectics with improved solubility, dissolution rates, bioavailability, and stability / P. S. Shaligram et al. *CrystEngComm*. 2023. Vol. 25. P. 3253–3263.
78. Warfarin metabolism and anticoagulant effect: A prospective, observational study of the impact of CYP2C9 genetic polymorphism in the presence

of drug-disease and drug-drug interactions / M. Muszkat et al. *Clin. Ther.* 2007. Vol. 29. P. 427–437.

79. Genotypes associated with reduced activity of VKORC1 and CYP2C9 and their modification of acenocoumarol anticoagulation during the initial treatment period / M. Teichert et al. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2009. Vol. 85. P. 379–386

80. AL-Eitan L. N., Almasri A. Y., Khasawneh R. H. Impact of CYP2C9 and VKORC1 Polymorphisms on Warfarin Sensitivity and Responsiveness in Jordanian Cardiovascular Patients during the Initiation Therapy. *Genes (Basel)*. 2018. Vol. 9(12). 578 p.

81. Mahendra B., Sundari K. H., Vimalakkannan T. Method developed for the determination of APX by using UV spectrophotometric. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry Analysis*. 2019. Vol. 1. P. 83–87.

82. Ramiseti N. R., Kuntamukkala R. Development and validation of a stability-indicating LC-PDA-MS/MS method for separation, identification and characterization of process-related and stress degradation products of rivaroxaban. *Royal Society of Chemistry Advances*. 2014. Vol. 4, № 44. P. 23155–23167.

83. Arruabarrena J., Coello J., Maspoch S. Raman spectroscopy as a complementary tool to assess the content uniformity of dosage units in break-scored warfarin tablets. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014. Vol. 465(1–2). P. 299–305.

84. Determination of warfarin and warfarin alcohols in dried blood spots by ultra-high performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization-tandem mass spectrometry (UHPLC-ESI-MS/MS) / S. Ghimenti et. al. *Microchem. J.* 2018. Vol. 136. P. 247–254.

85. Development of a stability-indicating HPLC method and a dissolution test for rivaroxaban dosage forms / E. Sourì et al. *Acta Chromatographica*. 2016. Vol. 283, № 3. P. 347–361.

86. Development and validation of a liquid chromatography method for the analysis of rivaroxaban and determination of its production-related impurities / B. Arous et al. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018. Vol. 52, № 5. P. 483–490.

87. Determination of total and unbound warfarin and warfarin alcohols in human plasma by high performance liquid chromatography with fluorescence detection / T. Lomonaco et al. *J. Chromatogr. A*. 2013. Vol. 1314. P. 54–62.
88. Mohamed A. A., Al-Ghobashy M. A., Lotfy H. M. Investigation of the profile and kinetics of degradation of rivaroxaban using HPLC, TLC-densitometry and LC/MS/MS: application to pre-formulation studies. *Bulletin of the Faculty of Pharmacy, Cairo University*. 2015. Vol. 53, № 1. P. 53–61.
89. Sahoo S., Mekap S. K. Assay comparison of rivaroxaban by new HPLC method with an existing method in tablet dosage form. *Pharma Biological Evaluation*. 2017. Vol. 4, № 3. P. 180–182.
90. Ramiseti N. R., Kuntamukkala R. Development and validation of a stability-indicating LC-PDA-MS/MS method for separation, identification and characterization of process-related and stress degradation products of rivaroxaban. *Royal Society of Chemistry Advances*. 2014. Vol. 4, № 44. P. 23155–23167.
91. Hussen A. Abdu. High-performance liquid chromatography (HPLC): a review. *Annals of Advances in Chemistry*. 2022. Vol. 6(1). P.10–20.
92. Harwood J. Modern Pharmaceutical Analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2022. Vol. 111, № 3. P. 987–1002.
93. Sadaphal P., Dhamak K. Review article on high-performance liquid chromatography (HPLC) method development and validation. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2022. Vol. 74(03). P. 23–29.
94. Liquid chromatographic methods for the determination of direct oral anticoagulant drugs in biological samples: a critical review / F. Gouveia et al. *Analytica Chimica Acta*. 2019. Vol. 1076. P.18–31.
95. Beckett A. H., Stenlake J. B. Practical Pharmaceutical Chemistry. 4th edition. London: Pharmaceutical Press, 2018. 528 p.
96. HPLC Method Development and Validation for the Determination of Apixaban and Clopidogrel in Novel Fixed-Dose Combination Tablets / N. Al-Shami et al. *Journal of Chemistry*. 2024. P. 1–11. [DOI: 10.1155/2024/2675736](https://doi.org/10.1155/2024/2675736).

97. Stability indicating RP-HPLC method development and validation for determination of nine impurities in apixaban tablet dosage forms robustness study by quality by design approach / V. B. Subramanian et al. *Journal of Biomedical Chromatography*. 2019. Vol. 34, № 1. P. 1–22.

98. Rajput R. S., Lariya N. A stability indicating method development and validation of apixaban in pharmaceutical dosage form by using RP-HPLC and in-vitro evaluation of apixaban suspension delivery through enteral feeding tubes. *Journal of Medical Pharmaceutical and Allied Sciences*. 2022. Vol. 11, № 1. P. 4358–4363.

99. Gholap S. V., Mankar S. D., Dighe S. B. Analytical method development and validation of Apixaban by RP-HPLC method. *International Journal of Analytical and Experimental Modal Analysis*. 2020. Vol. 6, № 12. P. 1817–1844

100. Development and validation of stability indicating RP-HPLC method of apixaban in commercial dosage forms / I. Al-Ani et al. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2019. Vol. 12, № 1. P. 241–251.

101. Erten Akbel I., Bulduk S., Gökçe S. A green HPLC method for the determination of apixaban in pharmaceutical products: Development and validation. *Journal of Chromatographic Science*. 2023. Vol. 61, № 2. P. 120–128.

102. Validation of HPLC and liquid-liquid extraction methods for warfarin detection in human plasma and its application to a pharmacokinetics study / Y. A. Chua et al. *ASM Science Journal*. 2019. Vol. 12. P. 1–10.

103. Determination of warfarin in volumetric absorptive microsampling by liquid chromatography-tandem mass spectrometry / Y. Harahap et al. *Heliyon*. 2024. Vol. 10. P. 1–11.

104. RP-HPLC method development and validation for estimation of rivaroxaban in pharmaceutical dosage forms / M. Çelebier et al. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013. Vol. 49, № 2. P. 359–366.

105. Dalbacke J., Dahlquist I., Persson C. Determination of warfarin in drinking water by high-performance liquid chromatography after solid-phase extraction. *Journal of Chromatography*. 1990. Vol. 507. P. 381–387.

106. Development and validation of a stability-indicating RP-HPLC method for the determination of fifteen impurities in rivaroxaban / P. Kumar et al. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2023. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0731708523000948>. (Date of access: 27.10.2024).

107. Sharma D., Chauhan V. R., Vyas K. B. Spectrophotometric Determination of Apixaban in Bulk Drug and Oral Dosage Formulation. *International Journal of Scientific Research in Science and Technology*. 2019. Vol. 6, № 3. P. 377–385.

108. Comparative studies of apixaban in bulk and its formulations by UV-Spectroscopy, zero derivatives and area under curve / P. S. Gangane et al. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2018. URL: <https://bit.ly/4gSLWTT> (Date of access: 27.10.2024).

109. Development and Validation of UV Spectrophotometric Methods for Apixaban in Tablets / S. A. Patel et al. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018. Vol. 5, № 4. P. 929–933.

110. Determination of rivaroxaban by different factor Xa specific chromogenic substrate assays: Reduction of interassay variability / J. Harenberg et al. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. 2011. Vol. 32, № 3. P. 267–271. DOI: 10.1007/s11239-011-0572-3.

111. Sensitive Validated Voltammetric Determination of Apixaban Using Multiwalled Carbon Nanotubes Modified Carbon Paste Electrode: Application To Drug Product And Biological Sample / Rizk Mohamed et al. *Analytical Methods*. 2017. Vol. 9. P. 2523–2534.

112. Ahmed Nief Rahman. Eco-Friendly Method for the Estimation of Warfarin Sodium in Pharmaceutical Preparations and Environmental Wastewater Samples. *Journal of Medical Healthcare*. 2021. Vol. 3, № 2. P. 1–3.

113. Anusha Kunala, Sowjanya Gummadi, Ganapaty Seru. Development and Validation of UV Spectrophotometric Methods for Apixaban in Tablets. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. 2018. Vol. 5, № 4. P. 929–933.